

Tesis de Posgrado

Análisis de las poblaciones y comunidades fúngicas en hoja de *Pinus taeda* L.

Venedikian, Nadia

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Venedikian, Nadia. (1995). Análisis de las poblaciones y comunidades fúngicas en hoja de *Pinus taeda* L.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2788_Venedikian.pdf

Cita tipo Chicago:

Venedikian, Nadia. "Análisis de las poblaciones y comunidades fúngicas en hoja de *Pinus taeda* L.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2788_Venedikian.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ANALISIS DE LAS POBLACIONES Y COMUNIDADES FUNGICAS
EN HOJA DE *Pinus taeda* L.

Lic. Nadia Venedikian

Directora: Dra. Alicia M. Godeas

Tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires

1995

152

*A la memoria de mi padre, Zirair Venedikian
a mi madre, mi esposo y mi hija*

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Alicia M. Godeas, directora de esta Tesis, por la sugerencia del tema, la orientación y el apoyo para llevar a cabo el plan propuesto, las horas dedicadas al análisis, discusión de los resultados y a la corrección de los originales.
- Al Dr. Jorge Wright, por contar con una biblioteca micológica amplia y actualizada y por haber contribuido a mi formación a través de varios cursos de grado y postgrado.
- A la Dra. Irma Gamundi, por la ayuda brindada en la identificación de *Pseudomorfea coffeae*.
- A la Dra. Elena Ancibor, por diversas consultas sobre anatomía foliar y por el préstamo de separatas sobre estos temas.
- A la Lic. Stella M. Bonaventura, por la orientación para la aplicación de métodos estadísticos multivariados, discusión de los resultados y la corrección del manuscrito correspondiente.
- A la Dra María Delia Bertoni y al Dr. Daniel Cabral, por el préstamo de libros y separatas.
- Al Dr. Oscar Mercuri, por toda su ayuda relacionada con el hardware y software de la computadora.
- A las Licenciadas Viviana Chiochio y Ana B. Menéndez, por la colaboración en el análisis estadístico de los datos de micelio y humedad.
- Al Ing. Marcelo Bakarcic, Director del INTA Delta en el periodo en que se llevó a cabo este estudio, por autorizarme el acceso a las plantaciones y proveer los datos técnicos necesarios.
- Al Servicio de Microscopía Electrónica del CONICET, por las fotografías de la superficie foliar.
- Al Dr. Eduardo Gros, director de UMIFOR, y la Dra Marta Marcote por el análisis químico de las muestras.
- A la UBA por el lugar de trabajo.
- Al CONICET por la financiación de este trabajo a través de subsidios.

- A la Lic. Alicia Martínez, compañera de tantos años, por estar siempre dispuesta a dar una mano.

- A la Dra. Susana Martínez, por brindar generosamente su tiempo para el fructífero intercambio de ideas.

- A la Sra Laura Del Busto, bibliotecaria de Micología, por su esmero y eficiencia, pero sobre todo por su amistad.

- A mis amigos y compañeros de la Facultad, por su apoyo y amistad.

- A mi hija, Melina, que me ayudo en la escritura y esperó pacientemente postergando tantos deseos hasta que termine la tesis.

1 INTRODUCCION

Las superficies aéreas de las plantas superiores, en condiciones naturales, presentan poblaciones de microorganismos amplias y variadas. Algunos de estos organismos son capaces de crecer extensamente en la superficie de plantas sanas, otros son sólo capaces de crecer cuando comienza la senescencia de los tejidos que las constituyen o cuando están física o fisiológicamente dañados. Un tercer grupo de organismos no crece de ningún modo, aún después de ser depositados sobre esa superficie por accidente.

1.1 FACTORES QUE DETERMINAN LA PRESENCIA Y ACTIVIDAD DE LAS POBLACIONES FUNGICAS

Según Dickinson (1976) son: a) disponibilidad de inóculo, b) naturaleza de la superficie aérea de las plantas, c) características químicas de la superficie, d) microclima en la superficie de las plantas, e) estado fisiológico del hospedante, f) naturaleza de las comunidades de plantas superiores y g) agroquímicos.

1.1.1 DISPONIBILIDAD DE INOCULO FUNGICO

Según Gregory (1973) la atmósfera es el medio esencial para la dispersión de muchos de los organismos que habitan la

superficie aérea de las plantas. La presencia de muchos hongos sobre las superficies aéreas podría estar directamente relacionado con la inoculación a través de la atmósfera. Este mismo medio está implicado en la producción de propágulos que son liberados, sobreviven y se dispersan en ese ambiente. La lluvia contribuye también a la dispersión de éstos de una planta a otra o a la redistribución de propágulos en una misma planta (Lacey, 1981).

Las partes inferiores de las plantas están contaminadas con hongos del suelo que son transportados por las salpicaduras de la lluvia.

1.1.2 LA NATURALEZA DE LA SUPERFICIE AEREA DE LAS PLANTAS

Las poblaciones microbianas epífitas están determinadas por la longevidad, la macro y micro-morfología y las características químicas de la superficie de los órganos de las plantas superiores.

Ruinen (1961) menciona en sus primeros trabajos que las hojas de plantas tropicales tienen en su superficie poblaciones densas y complejas que no tienen comparación con las hojas de vida corta de las plantas de zonas templadas, debido principalmente a la disponibilidad de un período largo para el crecimiento de los microorganismos. En contraste, las flores que tienen un corto período disponible para ser colonizadas tienen principalmente poblaciones de levaduras en sus superficies.

Cutler (1976) se refiere a la estructura y desarrollo de los tejidos superficiales de las plantas: epidermis y peridermis que ponen en contacto a las plantas con el medio. A través de ellos se realiza el intercambio y constituyen microambientes potenciales para los microorganismos.

Algunas estructuras (estomas, glándulas etc.) que son vías de comunicación de las plantas con el exterior también pueden servir como canales a la entrada de microorganismos de diverso tipo.

La pared celular de las células del tejido epidérmico generalmente es celulósica, en algunos casos puede estar lignificada y se lo denomina epidermis esclerosada. La cutícula es una capa de sustancias grasas o cutina que se deposita en la pared externa de las células epidérmicas. Además, la pared misma está cutinizada, eso es impregnada con cutina. La cutícula cumple función de protección al actuar como barrera para patógenos; además es resistente a la descomposición por microorganismos.

Entre la cutícula y la pared celular puede haber una capa de pectina (Eglinton and Hamilton, 1967).

A través de la cutícula se produce pérdida de agua y a veces de secreciones metabólicas, (Martín y Stott, 1957). Heslop y Harrison (1975) han observado poros en la cutícula de células secretoras y del estigma floral a través de los cuales se realizaría este proceso.

Por fuera de la cutícula, en las hojas y frutos, hay una capa de cera, que es secretada en forma de túbulos,

bastoncitos, gránulos o placas dando como resultado diversos patrones de distribución de la misma; siendo mayor con altas intensidades de luz (Juniper, 1959; Martin y Juniper, 1970; Steinmuller y Trevini, 1985). Estas ceras son importantes porque impiden que se moje la superficie ya sea con agua o soluciones con herbicidas, fungicidas o insecticidas. Estas ceras parecen llegar a la superficie a través de poros en la pared celular que han sido denominados ectodesmos y que según Lyon and Mueller (1974) no llegan hasta el protoplasto.

Los estomas están constituidos por un par de células oclusivas y células subsidiarias o acompañantes; estas últimas son células epidérmicas diferenciadas del resto por su tamaño y disposición. Las células oclusivas tienen cloroplastos mientras que las restantes células epidérmicas carecen de ellos excepto en algunas plantas acuáticas. Las células guardianas poseen proyecciones localizadas de pared gruesa o cutícula y a veces están lignificadas, especialmente en Gimnospermas.

Los estomas pueden estar a distintos niveles respecto de las restantes células epidérmicas, por encima, por debajo o al mismo nivel. Pueden darse sólo en la cara abaxial, sólo en la adaxial (*Nymphaea* sp.) o en ambas caras.

Las células guardianas asociadas con muchos hidatodos no tienen capacidad para controlar la apertura. Los hidatodos están ubicados en el margen o en el ápice de las hojas. Por ellos se libera agua en forma líquida por gutación; que es un proceso activo.

En la epidermis podemos encontrar otros tipos celulares tales como: células silicificadas, tricomas (que pueden o no ser glandulares) y diversos tipos de glándulas.

Las pequeñas irregularidades de la superficie como tricomas, glándulas, cristales de ceras, corrugaciones de la pared celular constituyen microhabitats apropiados para la deposición y desarrollo de propágulos de microorganismos (Dickinson, 1976; Allen et al., 1991).

1.1.3 CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LA SUPERFICIE DE LAS PLANTAS.

Está determinada por la interacción entre la cutícula (o la corteza) y las sustancias que provienen del interior de la planta, sustancias sintetizadas en la superficie y las provenientes del exterior que son depositadas allí.

Jeffree et al. (1976) se refieren al origen y a la estructura de las ceras epicuticulares, las que podrían usarse como carácter taxonómico ya que son suficientemente constantes en las especies de plantas, o sea que en sentido amplio dos individuos de la misma especie tienen ceras epicuticulares idénticas en ultraestructura y constantes en composición química cuando crecen en condiciones ambientales similares. La morfología de los cristales estaría relacionada con la composición química de los mismos.

Las células epidérmicas son el lugar de síntesis de esas ceras y la forma en que llegan a la superficie es motivo de controversia entre los autores que buscan una respuesta al interrogante.

La estructura de las ceras epicuticulares sufre modificaciones con el estado de madurez del órgano que se trate (hoja, fruto, flor) y los factores ambientales.

Se ha observado variación estacional en el contenido de ésteres y alcoholes de las ceras foliares de *Pinus sylvestris* (Schuck, 1969; Schütt and Schuck, 1973) y estas fluctuaciones podrían ser significativas en lo que concierne a la resistencia de las acículas a *Lophodermium pinastri* (Schröd.) Chev.

También contribuyen a definir las características químicas de la superficie de las plantas las sustancias lixiviadas del interior de la planta: los exudados. Sustancias tanto orgánicas como inorgánicas se acumulan en el agua que está en contacto con la superficie de las plantas (lluvia, rocío, niebla). Algunas de estas sustancias provienen del exterior, de la atmósfera, tales como partículas minerales, granos de polen. La mayoría tienen su origen en la planta y pasan a través de los tejidos más externos al agua en contacto con la superficie, este proceso se llama lixiviación (Tukey, 1971).

Las sustancias lixiviadas incluyen todos los minerales esenciales y otros elementos que se encuentran comúnmente en las plantas, éstos son los macro y microelementos, sustancias orgánicas tales como azúcares simples, sustancias pécticas,

aminoácidos, ácidos orgánicos, reguladores de crecimiento, vitaminas, alcaloides, sustancias fenólicas.

A medida que la hoja madura aumenta su susceptibilidad a la pérdida de nutrientes por lixiviación alcanzando un pico en la senescencia. Este fenómeno estaría en parte relacionado con la "mojabilidad" de la hoja; las hojas jóvenes son hidrofóbicas y esta propiedad decrece con la maduración. Las hojas de plantas sanas y vigorosas son menos susceptibles al "leaching" o lixiviación que las hojas dañadas ya sea por microorganismos, insectos, clima adverso, desequilibrio nutricional o fisiológico o daño mecánico.

El mecanismo de "leaching" es similar al de absorción de sustancias por la hoja, los cationes son lixiviados a partir de un "pool" de cationes intercambiables, involucrando en el proceso el llamado "espacio libre" dentro de la planta (Tukey et al., 1965). Serían reacciones de intercambio que tendrían lugar en la superficie de la hoja. Los cationes que se encuentran en sitios de intercambio de la cutícula se intercambiarían con protones de la solución de "leaching" y/o los cationes pasarían directamente del interior de la hoja.

Los estomas no son las vías principales de pérdida de nutrientes y se ha demostrado que hay mayor pérdida en superficies con menor número de estomas o sin ellos que en los que el número es mayor (Lausberg, 1935 y Morgan, 1963).

Sin embargo a la superficie llegan sustancias por mecanismos activos como la gutación, por hidatodos y por tricomas (Wilson, 1923 y Helder, 1956).

El fenómeno de "leaching" interviene así en el equilibrio nutricional en las plantas.

Godfrey (1976), hace una revisión de los trabajos relacionados con el fenómeno de "leaching", posteriores a 1971 y su influencia en las poblaciones de microorganismos de la superficie de plantas. Enumerando las diferentes sustancias que fueron determinadas en los lixiviados.

Good (1974), purifica un ácido semejante a giberélico y otro semejante a abscísico en lixiviados de hojas de *Picea sitchensis* y *Betula péndula*.

La influencia de las sustancias lixiviadas sobre las poblaciones microbianas de las superficies de las plantas es muy compleja.

La composición de estas sustancias varía de una planta a otra y también con la edad del órgano que se trate.

La respuesta de los microorganismos a estas sustancias también es diferente, algunas estimulan el crecimiento mientras que otras resultan inhibitoras (Purnell, 1971). Las primeras estarían relacionadas con la nutrición y serían carbohidratos y aminoácidos.

Entre las sustancias inhibitoras producidas por las plantas están las fitoalexinas; el crecimiento de los hongos del filoplan (activo en la senescencia) estimula la producción de las mismas.

También contribuye al conjunto de sustancias de la superficie, el proceso de gutación, los productos del metabolismo de los microorganismos, sustancias azucaradas

producidas por áfidos, partículas de polvo, granos de polen.

1.1.4 EL CLIMA EN LA SUPERFICIE DE LAS PLANTAS.

Influye en varios niveles: en el abastecimiento, en el crecimiento, en la supervivencia y en la dispersión de los hongos epífitos.

Las regiones climáticas son las que tienen mayor importancia en la definición de las poblaciones de microorganismos de la superficie. Por otra parte la humedad de la superficie de las hojas, el rocío y la humedad relativa son más importantes que la temperatura en la determinación de la composición de las poblaciones epífitas.

Las variaciones estacionales determinan en las plantas procesos tales como: iniciación del crecimiento, caída de las hojas y floración. Como consecuencia de la estacionalidad la superficie de las hojas está expuesta a valores extremos de humedad, temperatura e intensidad de luz que afectarán sus poblaciones de microorganismos.

Los factores climáticos importantes para el desarrollo fúngico son:

1.1.4.1 TEMPERATURA: el valor promedio determina la velocidad de crecimiento y los valores extremos afectan la supervivencia de las hifas y propágulos.

1.1.4.2 LLUVIA Y ROCÍO: moja la superficie permitiendo la germinación y el crecimiento, influye en el fenómeno de lixiviación o "leaching", liberación y dispersión de las

esporas.

1.1.4.3 HUMEDAD: influye en la supervivencia y crecimiento, afecta la liberación de las esporas.

1.1.4.4 VIENTO: afecta la liberación y dispersión de las esporas.

1.1.4.5 LUZ: actúa sobre la lixiviación, esporulación, liberación de esporas, germinación y crecimiento. (Leach, 1967; Pennycook y Newhook, 1974; Cole, 1976).

1.1.5 ESTADO FISIOLÓGICO Y SALUD DE LA PLANTA HOSPEDANTE.

El vigor de la planta hospedante parecería ser significativo en lo que respecta a las comunidades de los hongos epífitos ya que el estado nutricional de la planta y la edad de los distintos órganos afecta la cantidad y la calidad de los exudados.

También la cantidad de tejidos nuevos disponibles para ser colonizados varía con la estación y depende de los nutrientes disponibles.

Es difícil establecer el efecto de una enfermedad sobre las poblaciones de la superficie, dado que es problemático conocer la interacción patógeno/hospedante/saprófito.

Muchos métodos de estudio no son aplicables a tejidos sanos y enfermos de manera comparable, es importante utilizar aquellos que permitan seguir el comportamiento de un hongo en su ciclo de vida.

1.1.6 NATURALEZA DE LAS COMUNIDADES DE PLANTAS SUPERIORES.

Entre las comunidades de plantas superiores es necesario distinguir la vegetación natural o seminatural y los cultivos agronómicos. El último caso constituye un habitat excepcionalmente favorable para ciertos microorganismos epifitos ya que la sincronización en el desarrollo de los cultivos, la alta densidad de plantas y el crecimiento uniforme en un ambiente nutricionalmente enriquecido, resultan favorables para muchos microorganismos de la superficie.

1.1.7 AGROQUIMICOS:

Se utilizan para el control de malezas, plagas, patógenos, para la fertilización del cultivo y regulación del crecimiento. Estas sustancias químicas se aplican en la superficie aérea de las plantas y simultaneamente con el logro de sus objetivos dañan al hospedante y a los organismos epifitos (Dickinson, 1973; Dickinson y Wallace, 1976; Hislop, 1976).

1.2 CLASIFICACION DE LOS HONGOS EPIFITOS DE HOJAS

Dickinson, (1976) propone la siguiente clasificación.

-A EPIFITOS NO PATOGENOS

- 1 Habitantes del filoplano: capaces de crecer y esporular en condiciones climáticas y nutricionales fluctuantes
Ej: *Sporobolomyces* sp., *Aureobasidium* sp., *Cladosporium* spp., fumaginas, especies de *Chaetothyriaceae*.
- 2 Invasores del filoplano: que pueden crecer extensamente sólo cuando las condiciones son particularmente favorables Ej: *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Stemphylium* sp.
- 3 Saprófitos primarios: incapaces de crecer extensamente hasta la senescencia Ej: *Ascochyta* sp., *Leptosphaeria* sp., *Pleospora* sp., *Phoma* sp.

-B PATOGENOS

- 1 Patógenos que están total o parcialmente restringidos al filoplano Ej: *Erysiphe* sp.
- 2 Patógenos que crecen extensamente o sobreviven durante largos períodos en el filoplano antes de penetrar Ej: *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Drechslera* sp., *Septoria* sp.

-3 Patógenos que son incapaces de infectar al hospedante sobre el que han sido depositados. Pueden tener un crecimiento limitado o permanecer en dormición.

-C EXOTONOS (Park, 1957).

-1 Hongos para los cuales el filoplano constituye un eslabón esencial en su ciclo de vida el que se completa en otra parte Ej: *Cryptococcus* sp., *Myrothecium* sp., *Pilobolus* sp.

-2 Hongos que han sido depositados sobre las hojas pero que son incapaces de obtener ventajas de ese habitat Ej: basidiosporas de *Ganoderma* sp. y *Serpula* sp. patógenos como B3, hongos de suelo.

A.1 Los habitantes del filoplano incluyen especies que están mejor adaptadas a vivir en hojas vivas. Estos hongos completan su ciclo de vida o la mayor parte de él en este habitat y no estarían implicados en procesos de descomposición. Algunos de estos hongos pueden crecer casi continuamente, otros tienen estructuras vegetativas que les permiten alternar entre crecimiento y reposo. Un tercer grupo esporula en forma abundante si se dan las condiciones ambientales adecuadas en la superficie, dispersando las esporas eficientemente las cuales inician el crecimiento vegetativo, cuando las condiciones vuelven a ser favorables. Estas categorías no están delimitadas en forma precisa pero

hay ejemplos de los tres tipos de comportamiento. El primer tipo de adaptación puede ejemplificarse con epífitos de plantas tropicales que crecen en condiciones de humedad alta. Especies de Microthyriaceae y Chaetothyriaceae forman extensas colonias sobre las hojas. En las mismas condiciones las fumaginas pueden desarrollar, sobre plantas sanas, durante largos períodos (Hughes, 1966, 1974). Estos hongos se caracterizan por la producción de varios tipos de esporas que les permiten la supervivencia en condiciones ambientales desfavorables.

El segundo grupo estaría ejemplificado con *Aureobasidium* sp. y *Cladosporium* sp. que crecen en el filoplano dando extensas colonias hifales. Forman microesclerocios que les permiten sobrevivir a la desecación y otros factores ambientales adversos (Pugh y Buckley, 1971; Ruscoe, 1971; Pugh, 1980; Pugh y Boddy, 1988).

Las hifas de paredes gruesas y pigmentos oscuros contribuyen también a asegurar la supervivencia.

Sporobolomyces sp. es un ejemplo del tercer tipo, comienza a crecer rápidamente cuando las condiciones son favorables, se reproduce por gemación y por formación de basidiosporas; de ese modo se dispersa dentro y fuera del hospedante. No puede sobrevivir por períodos prolongados en condiciones adversas pero la población puede extenderse rápidamente a partir de reservorios que quedan en zonas de la superficie protegidas (Burg, 1974).

Sporobolomyces, dentro de la familia de las

Sporobolomycetaceae, es el más importante de los géneros del filoplano. (Last, 1955, 1970; Ruscoe, 1971; Pady, 1974; Dickinson y Wallace, 1976)

Tilletiopsis sp. también se lo aisló de hojas pero requiere temperaturas más altas para crecer que *Sporobolomyces* sp.

A.2 Los invasores del filoplano tienen un patrón de desarrollo restringido mientras la superficie de la hoja permanece inalterada. Los cambios que debe sufrir la hoja incluyen variaciones en la morfología y composición química incluyendo acumulación de materiales provenientes de otras partes. La erosión de las ceras epicuticulares, el daño a tricomas y a la cutícula por contacto entre plantas, alteraciones en la fisiología y metabolismo del hospedante tendrían efecto sobre muchos organismos; así las secreciones de áfidos ("honeydew") y los granos de polen tienen un efecto estimulante (Warren, 1972; Norse, 1972a; Burg, 1974).

Una vez que se dan estas alteraciones en la hoja, gran número de hongos están capacitados para crecer en el filoplano, especialmente los saprófitos primarios que atacan los tejidos recién muertos.

La distinción entre invasores del filoplano y habitantes del filoplano se basa en que los primeros esporulan con dificultad en hojas verdes mientras que en medios de cultivo, crecen rápida y extensamente.

Alternaria sp., *Epicoccum* sp. y *Stemphylium* sp. se citan para filoplano pero no se tienen pruebas de su continuo

crecimiento en hojas verdes y sanas. En cambio en hojas senescentes de diferentes plantas se han visto colonias de estos hongos que esporulan. Dickinson (1967) ha recalcado el hecho de que estos hongos obtienen ventajas de los cambios que ocurren en las hojas con la senescencia. Sharma y Mukerji (1976) sugieren, en base a sus experiencias, que estos hongos pueden colonizar hojas verdes regularmente. Otros estudios han sugerido que pueden acelerar la senescencia de manera que la planta muere más temprano, que si estuvieran ausentes. La principal evidencia para esta hipótesis proviene de experiencias realizadas a campo en hojas de cereales. La aplicación de fungicidas inhibe a los microorganismos y correlacionado con esto se observa que las hojas permanecen verdes por mayor tiempo. (Dickinson, 1973 a y b; Dickinson y Walpole, 1975; Dickinson y Wallace, 1976).

Se han hecho experiencias en laboratorio y en cámaras de cultivo para confirmar los resultados de las experiencias de campo, pero no se ha tenido éxito, principalmente por la dificultad en la obtención de poblaciones del filo plano semejantes a los de campo.

Bennett (1928) llegó a conclusiones similares en lo que concierne al rol de *Cladosporium herbarum*, que él considera especie semi-parásita, que una vez establecida acelera la muerte de los tejidos.

A.3 Algunos saprófitos primarios rara vez o nunca crecen en la hoja verde, sus propágulos se acumulan en la hoja antes de la senescencia y permanecen en dormición hasta la muerte

de los tejidos. Los estudios de Dickinson y Wallace, (1976) demostraron que están capacitados para germinar tempranamente en la hoja verde lo que le permitiría evitar el efecto antagónico de otros organismos del filoplano y colonizar rápidamente un volumen considerable de tejidos.

Entre los saprófitos primarios estarían las especies de hongos restringidas a ciertos hospedantes; mostrando ciertas tendencias al parasitismo. Este fenómeno no se da en los grupos A.1 y A.2, habitantes e invasores del filoplano o por lo menos no se puede afirmar categóricamente hasta realizar más experiencias de observación directa que permitan conocer el rol exacto de cada especie fúngica en una variedad de distintos hospedantes.

Debe destacarse que muchos de los hongos filamentosos que se citan en hojas verdes y sanas pueden ser capaces de vivir como parásitos en algunos o en todos los hospedantes que ellos habitan.

Especies de *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Phoma* y *Stemphylium* actúan como patógenos en ciertos hospedantes. No se conoce exactamente si también actúan como patógenos débiles en hospedantes a los que colonizan epífitamente en forma no agresiva, pero es evidente que, conocer más a fondo el comportamiento puede aportar al conocimiento de la interacción entre los componentes saprófitos y parásitos de las poblaciones microbianas de la superficie.

B.1 Entre los patógenos bien definidos de hojas, los "mildius pulverulentos" constituyen una categoría especial

que se limita casi exclusivamente a la superficie foliar pero se diferencia de los epífitos no patógenos por la formación de haustorios que funcionan como órganos de absorción. Muchos patógenos infectan las hojas luego de un período corto de crecimiento epífito pero otros tienen un desarrollo espacial y temporal extenso antes de la invasión (Pace y Campbell, 1974; Clark y Lorbeer, 1976).

Sin embargo algunos patógenos permanecen latentes sobre hospedantes susceptibles durante largos periodos hasta activarse ya sea en la senescencia o con un cambio climático. Este hecho es difícil de evaluar ya que implica la existencia de una infección asintomática latente. (Ruscoe, 1971; Norse, 1972 a).

También es posible que algunos saprófitos crezcan como endofitos y de ese modo complicarían cualquier estudio de los organismos de superficie (Pugh y Buckley, 1971).

Un número considerable de esporas de patógenos y otros propágulos se acumulan sobre hospedantes no susceptibles. Estos se suman a los nutrientes provenientes de otros lados y depositados sobre la superficie de la hoja, aunque en algunos casos pueden germinar antes de reconocer que el medio no es apropiado para que se establezcan con éxito en él. Las características físicas y químicas de la superficie tienen un rol importante en el éxito del crecimiento de los patógenos fúngicos sobre y luego dentro de la hoja. La especificidad hacia el hospedante es menos discriminante durante el crecimiento pre-penetración de la mayoría de los patógenos

(Allen et al., 1991).

Varios estudios demostraron la forma en que los microorganismos pueden atacar esporas de patógenos en el suelo (Mayfield et al., 1972; Wong y Old, 1974). Parecería que no hay ninguna razón que limite el fenómeno a ese ambiente.

Park (1957) usó el término *exotonos* para describir un grupo de hongos presentes en el suelo, pero para los que éste no es el sustrato habitual y no se los encuentra nunca en estado activo en ese lugar. Entre los hongos *exotonos* de hojas, los más interesantes son aquellos que necesitan estar allí para completar su ciclo, tal es el caso de los hongos *coprófilos*, cuyas esporas son ingeridas junto con la hierba por los animales y luego colonizan el estiércol. Estas esporas necesitan el paso por el tracto digestivo para germinar. Como *Pilobolus* sp., *Sordaria* sp. y *Coprobria* sp.

También pertenecen a este grupo algunos patógenos de animales como por ejemplo *Pithomyces chartarum*, *Myrothecium* sp., *Metarrhizium* sp., *Cryptococcus* sp. y *Candida* sp. cuyos propágulos de infección están presentes en las hojas y pueden ser ingeridos por animales que pastan o que viven sobre las hojas (Lamb y Brown, 1970; Menna, 1971; McKenzie, 1971; Davenport, 1976)

El filoplano puede también actuar como una trampa para propágulos que permanecen en dormición. Algunos de ellos germinan y crecen en medios de cultivo utilizados para conocer la micoflora de la hoja, especialmente en los métodos

en que el agua de lavado se mezcla con medio de cultivo, mientras que otros sólo crecen en condiciones precisas y selectivas. Dickinson y Wallace (1976) utilizando técnicas de examinación directa reconocieron las esporas mencionadas y vieron que no germinaban y además no se acumulaban en la hoja sino que se perdían entre dos muestreos. No se conoce el destino de las mismas, si son destruidos microbiológicamente o arrastrados por el viento o la lluvia. Si se diera la última posibilidad llegarían al suelo donde podrían desarrollar.

1.3 ADAPTACIONES A LA VIDA EPIFITA

Se ha sugerido que la micoflora de superficies expuestas a luz solar directa tiene un mayor número de especies dematiáceas. Es cierto que varios de los hongos filamentosos más frecuentemente hallados como *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., y *Stemphylium* sp., pueden formar hifas de paredes oscuras (Pugh y Boddy, 1988). Ruscoe (1971), encontró que la superficie superior de las hojas de *Nothofagus* sp. tenía mayor número de especies pigmentadas. Sin embargo muchos epífitos exitosos en un amplio rango de climas tienen células de paredes hialinas, entre ellos se incluyen la mayoría de las levaduras y los mildius pulverulentos. Por lo tanto, el efecto adverso de la radiación sobre los epífitos es una hipótesis que debe someterse a investigación, aunque no hay dudas sobre el hecho de que la radiación caliente y seca la

superficie de la hoja (Dickinson, 1976).

Los microorganismos epífitos soportan fluctuaciones de humedad y temperatura. El repetido secado y humedecimiento produce la muerte de muchos hongos pero otras especies son capaces de sobrevivir esos cambios con poca pérdida de viabilidad (Good y Zathureczky, 1967; Diem, 1971)

Se sabe poco sobre el efecto de las altas temperaturas sobre los hongos epífitos; para las temperaturas, por debajo del punto de congelamiento se conocen los trabajos de Mazur y Weston (1956) y Meyer, Sinclair y Nagy (1975).

La supervivencia parece estar relacionada directamente con la velocidad de congelamiento y descongelamiento y con la edad fisiológica del organismo.

El crecimiento y la reproducción de los organismos de la superficie aérea de las plantas debe tener como corolario la liberación y dispersión de las esporas. Los mecanismos involucrados, que incluyen descarga violenta fueron analizados por Meredith (1963, 1966), en cambio los pasivos como salpicaduras de lluvia, formación de largas cadenas de conidios y transporte por vectores animales fueron estudiados por Davenport (1976), Grace y Collins (1976) y Pedgley (1971).

2 ANTECEDENTES

La presencia de los hongos en la superficie de las plantas ha sido reconocida hace más de un siglo. En 1866, De Bary menciona a *Dematium pullulans* en ese habitat.

La existencia de una microflora en las superficies foliares fue descrita por primera vez por Ruinen (1956), Last (1955) y Kerling (1958). Este campo atrajo a científicos de diferentes disciplinas como micólogos, ecólogos microbianos y fitopatólogos. Estos últimos fueron los que le dieron mayor ímpetu a los estudios de estos microorganismos.

A partir de 1920 se produjo un incremento de la producción científica relacionada con procesos de infección producidos por bacterias, hongos y virus. Hasta 1950 y en relación con patologías de plantas se consideraba al sistema constituido por tres elementos : hospedante, patógeno y condiciones ambientales. Luego de 1950 se empezó a tener en cuenta la influencia de otros microorganismos. Hacia esa época y simultáneamente en Indonesia y en Inglaterra se propuso el término filosfera para designar al ambiente creado por la hoja y colonizado por bacterias, levaduras y hongos, que implica un habitat tridimensional. También se usó filoplano para referirse al área que está en contacto directo con la superficie foliar. Estos términos resultan imprecisos cuando se trata de las hojas que forman parte de la yema; Leben (1971), se refiere a estos estadios como gemisfera, creando el término para hojas no expandidas de hasta 1,5cm de largo.

En la década de los 60' y 70' se desarrollaron los métodos necesarios para estudiar distintos aspectos sistemáticos, ecológicos y fisiológicos de estos organismos, que van desde el aislamiento directo por contacto con medio nutritivo (Last, 1955; Ruinen, 1956, 1961) hasta el lavado de las superficies con recolección y siembra de la solución resultante (Rishbeth y Meredith, 1957); incubación de trozos de hojas y tallos en cámara húmeda (Hudson y Webster, 1958) y maceración (Menna, 1959a).

Los lavados sucesivos (Chester, 1948; Hudson y Webster, 1958) permitieron separar a los organismos esporulados de los que se encuentran creciendo vegetativamente, éstos se aislaron en medios nutritivos como APG, ME o diferenciales con el agregado de celulosa, agar-rosa de Bengala, agar glu-caseína.

Este método fue perfeccionado por Harley y Waid (1955) y los primeros en utilizarlos fueron Kendrick y Burges (1962) y Dickinson (1965), quien agregó a los lavados Tween 80, para bajar la tensión superficial y permitir el desprendimiento más fácil de las esporas.

Hoog y Hudson (1966) utilizaron el método de caída de las esporas que permite aislar hongos productores de balistosporas y Langeron y Vanbreuseghem (1965), desarrollaron la metodología apropiada para estudiar las colonias fumaginoides.

En 1935 Dawies esteriliza las superficies foliares con nitrato de plata, posteriormente Kendrick y Burges (1962)

retoman el uso de la esterilización superficial de la hoja con el agregado de diluciones de cloruro de mercurio; Hering (1965), le agrega alcohol metílico para una mayor eficiencia. Estas técnicas permiten eliminar los microorganismos de las superficies esterilizadas pemitiendo el aislamiento de aquellos que se encuentran creciendo dentro del tejido.

El conocimiento de la relación entre los hongos y su hospedante se desarrolló por varios métodos:

Observación directa realizada sobre cortes transversales y tinciones diferenciales, la mayoría con azul de trypan; hojas clarificadas, con hidrato de cloral y teñidas con azul de algodón al lactofenol (Shipton y Brown, 1962), y disecciones del tejido epidérmico (Lehmann y Hudson, 1977).

Técnicas microscópicas más sofisticadas que incluyen el uso de MEB (Pugh y Buckley, 1971; Bernstein et al., 1973) y el microscopio de epifluorescencia (Bernstein et al., 1973; Bernstein y Carroll, 1977) permitieron agudizar las observaciones y realizar otro tipo de cálculos como: longitud de micelio, volumen del mismo, patrones de colonización etc.

También se desarrollaron una serie de Métodos de observación indirectos que posibilitaron el estudio de la distribución de los micelios y propágulos en las superficies foliares. La técnica usada fue la de impronta en: collodion (Ruinen, 1961); en nitrato de celulosa (Dickinson et al., 1974) y esmalte de uñas (Wildman y Parkinson, 1978), que en capas delgadas permitieron copiar la supeficie a observar.

Hudson (1962), comienza a cuantificar los hongos presentes

en distintos sectores de la hoja. Ruscoe (1971); Bernstein et al. (1973); Bernstein y Carroll (1977) hacen estimación de cobertura y Carroll (1979) calcula el volumen celular de la infección.

Los estudios de las comunidades se enfocaron de distintas formas, desde Patrones de distribución (Bernstein y Carroll, 1977; Carroll, 1979, en *Pseudotsuga menziesii*; Bertoni y Cabral, 1988, en *Eucalyptus viminalis*), pasando por cuantificar los procesos que determinan cambios en la comunidad hasta la influencia que los factores bióticos y abióticos tienen sobre la actividad microbiana y por lo tanto la dinámica de la población.

Webster (1956; 1957), estudió patrones de colonización en *Dactylis glomerata*; Hudson y Webster (1958), hicieron comparaciones con lo que ocurre en *Agropyron repens*. Estudios similares, fueron llevados a cabo por Meredith (1962), en hojas de banana y Hudson (1962), en *Saccharum officinarum*.

Los ecólogos de comunidades incluyendo aquéllos que trabajan en el filoplano tendieron a enfatizar los estudios sobre fuerzas internas y dinámica de la comunidad (Cabral, 1985). Pusieron el énfasis en describir comunidades que crecen y se nutren en relación con el tipo de hoja (Ruinen, 1956, en *Drymoglossum piloselloides*; Rishbeth y Meredith, 1957 en *Pinus sylvestris* y *P. nigra*; Gremmen, 1963 en varias especies de coníferas; Dickinson, 1965; Dickinson y Morgan-Jones, 1966 en *Halimione portulacoides*; Menna, 1971, en pasturas, en relación con hongos tóxicos; Godfrey, 1974 en

Pteridium aquilinum; Gourbière, 1975 en hojas de *Abies alba*; Gremmen, 1976 en *Pinus sylvestris* y *P. nigra*; McBride y Hayes, 1977 en *Larix decidua*; Latch y McKenzie, 1977 en *Lolium perenne* y *L. multiflorum*; Bopaiah et al., 1978 en varias especies de plantas cultivadas, malezas y forestales; Minter, 1981 en distintas especies de *Pinus*; Miller y Roy, 1981 en soja; Pennycook y Newhook, 1981 en *Malus sylvestris*; Breeze y Dix, 1981 en *Acer platanoides*; Mishra y Dickinson, 1981 y 1984 en *Ilex aquifolium*; Cabral, 1982, 1985 en *Eucalyptus viminalis*; Legault et al., 1989a en *Pinus resinosa* y *P. banksiana*; Sieber Canavesi y Sieber, 1993 en *Abies alba*).

Así estos estudios aportaron una gran cantidad de información acerca de la identidad y predominancia de los microorganismos encontrados en diferentes hojas a través del tiempo.

La influencia de los factores abióticos en la dinámica poblacional, también fueron analizados, considerándose situaciones tales como el stress hídrico, la luz ultravioleta, la desecación, el calor, la contaminación, la lixiviación, etc. (Godfrey, 1974; Dickinson y Wallace, 1976; Lindsey y Pugh, 1976; Bashi y Fokkema, 1977; Andrews et al., 1980; Mishra y Das, 1981; Mishra y Dickinson, 1984; Kahlki et al., 1986).

El conocimiento de estrategias ecológicas alternativas (Pugh, 1980), llevó al reconocimiento de las investigaciones realizadas acerca de los requerimientos físicos y

nutricionales que le permitieron a los organismos crecer y sobrevivir en el filoplano. Los primeros estudios sobre actividad enzimática se debieron a Reese y Levinson (1952); continuando esta línea, Ruinen (1963) investigó la actividad de lipasas; Hudson (1971), clasificó a los organismos de acuerdo con la posibilidad, de las distintas especies aisladas de la hoja, de degradar distintos sustratos en celololíticos, pectinolíticos, etc.

Investigaciones adicionales se enfocaron hacia la interacción entre microorganismos, así la relación: microflora fúngica residente/transitoria (Lamb y Brown, 1970); parásitos/saprobios (Gremmen, 1976; Frankland, 1966); patógeno-saprobio (Norse, 1972 a; Sharma y Garg, 1979; Ivory, 1972); endofito-saprobio, saprobio-saprobio, endofito-endofito (Faifer y Bertoni, 1938) se testearon de diferentes formas. La caracterización de los hongos epífitos, dentro del continuum r-K, puede ser posible usando este tipo de datos. Sin embargo estos estudios no alcanzan para explicar los cambios de las comunidades que se suceden en la hoja, el próximo paso será posiblemente considerar las especies aisladas o en grupo y determinar cuáles son los procesos que limitan su estadio en el filoplano.

Se reconoció el posible rol de las esporas del aire (Wildman y Parkinson, en *Populus tremuloides*, 1978) y de la semilla (Klincare, et al., 1971 en *Hordeum* sp., *Avena* sp., *Secale* sp., *Medicago* sp., *Lupinus* sp. y *Beta* sp.) como la fuente de infección y su influencia en las poblaciones del

filoplano (Last, 1955; Collins y Hayes, 1976; Dickinson, 1976), mientras que las superficies de las hojas actuarían como trampas para las esporas de los hongos (Gregory, 1973, Allen, 1991).

Otros trabajos mostraron la evolución de una población fúngica inoculada (Diem, 1974; Godfrey, 1974; Collins, 1976, en *Anthirrinum* sp.; Mishra y Dicckinson, 1984) utilizando para ello especies patógenas.

Investigaciones adicionales sobre dinámica poblacional, consideran a las hojas como un reservorio de microorganismos que son dispersados por el aire (Grace y Collins, 1976).

Esencialmente la comunidad del filoplano se considera abierta y continuamente los individuos entran y salen de ella, por lo tanto futuros estudios deben considerar en detalle los procesos de emigración e inmigración, además de los que se consideran actualmente (crecimiento y posterior muerte o reemplazo de las especies) como los factores abióticos que los influyen (Kinkel, 1991).

La dinámica sucesional ha sido estudiada en distintas plantas y en distintos ambientes utilizando uno o varios de los métodos desarrollados: Hudson (1962), en *Saccharum officinarum*; Hoog y Hudson (1966), en *Fagus sylvatica*; Dickinson y Morgan-Jones (1966), en *Halimione portulacoides*, especialmente en la evolución de Sphaeropsidales; Dickinson (1967), en *Pisum sativum* hasta la hojarasca; Sinha (1971); Ruscoe (1971); Loory (1972); Sherwood y Carroll (1974) en *Pseudotsuga menziesii*; Gourbière (1974 a y b, 1975), en *Abies*

alba; McBride y Hayes (1977); Sharma y Garg (1979), en cebada relacionado con patógenos; Baker et al. (1979), sobre varias especies de plantas de Hawái; Pennycook y Newhook (1981), en *Malus sylvestris*; Mishra y Das (1981), en *Pinus kesiya*; Mishra y Dickinson (1981, 1984), en *Ilex aquifolium*; Andrews y Kenerley (1980), en manzana; Cabral (1982, 1985), en *Eucalyptus viminalis*; Gourbière (1983); Legault et al. (1989 a); Pandey (1990), en hoja de *Psidium guajaba*; Sieber Canavesi y Sieber (1993), en *Abies alba*.

En estos estudios la metodología usada es muy diversa y va desde los aislamientos en forma indirecta (lavado de hoja o impresión) con enumeración de las especies presentes sobre las hojas, hasta cuantificación del crecimiento hifal (Bernstein et al., 1973 en *Pseudotsuga menziesii*; Bernstein y Carroll, 1977) y esporulación en el tiempo.

La tendencia general muestra pequeñas poblaciones de microorganismos en las hojas jóvenes aumentando el número de propágulos y el desarrollo hifal con el tiempo y la edad de la hoja (Dickinson, 1976; Dreeze y Dix, 1981).

Cambios en la composición de la comunidad fúngica en el tiempo también fue descrito por: Pugh y Buckley (1971) en *Acer pseudoplatanus*; Lindsey y Pugh (1976), en *Hippophae rhamnoides*; Wildman y Parkinson (1978), en *Populus tremuloides*; llegando Visser y Parkinson (1975), hasta la hojarasca.

La dificultad para analizar e interpretar los datos ha sido atribuida a que el sustrato envejece y cambia con el

tiempo independientemente de la interacción o influencia de las distintas especies de hongos con el sustrato. Además existen cambios en el ambiente como la temperatura, humedad relativa y radiación solar que influyen en los organismos que se desarrollan en la hoja (Last, 1955; Menna, 1971; Sinha, 1971; Diem, 1974; Collins y Hayes, 1976; Latch y McKenzie, 1977; Breeze y Dix, 1981; Mishra y Dickinson, 1981; Cabral y Collantes, 1992) y que por distintos métodos llegan a su superficie.

Utilizando alguno de los métodos de esterilización se aíslan los endofitos. Estos organismos colonizan los tejidos internos de las plantas, causan infecciones asintomáticas. Se excluyen a los hongos patógenos y los mutualísticos como las micorrizas (Carroll, 1976). Ruscoe (1971), discriminó endofitos y colonizadores del filoplano de *Nothofagus truncata*; Norse (1972 a), estudió los endofitos en tabaco, luego Gourbière (1974 a, b, 1975) discriminó y cuantificó hongos del filoplano y endofitos en *Abies alba*. Estudios posteriores se deben a Carroll et al. (1977); Carroll y Carroll (1978), en varias especies de coníferas; Barklud (1987), en *Picea abies*; Cabral y Bertoni (1988), en *Eucalyptus viminalis* y Legault et al. (1989 b), en dos especies de *Pinus*, *P. resinosa* y *P. banksiana*; Bertoni et al. (1993), en distintas especies de *Festuca*.

Todas estas investigaciones muestran que la composición de las comunidades de endofitos varía con el lugar de recolección, la posición de la hoja en la planta, y la

topografía del lugar. Los taxones dominantes en cada caso son escasos (1 o 2) y la riqueza de especies y/o frecuencias aumenta con la edad de la hoja.

Si consideramos a la hoja en su totalidad la colonización en ella se inicia con: un primer grupo de hongos del filoplano, seguidos (en hoja madura) por hongos endofitos (Wildman y Parkinson, 1979; Cabral, 1985); luego hacia la senescencia los hongos típicos del filoplano pueden colonizar el interior de la hoja (Canavesi, 1987; Petrini, 1992); por último un tercer grupo formado por hongos saprobios típicos del suelo (Gourbière, 1974b; Petrini, 1992), se establecen en la hoja 4-6 semanas después que ésta ha caído. Dix y Webster (1995) establecen, en cambio, que los primeros colonizadores son los endofitos

La comunidad de las hojas verdes sanas puede ser considerada en equilibrio hasta que comienza la senescencia. Los tejidos senescentes permiten gradualmente el establecimiento de una nueva comunidad, formada principalmente por hongos saprobios (Espinosa-García y Langenheím, 1990).

La descomposición de la hojarasca comienza entonces en la hoja viva. Pugh (1958), en *Carex paniculata*; Kendrick y Burges (1962), en *Pinus sylvestris*; Watson et al. (1974), en *Pinus taeda* y otras especies de madera dura; Lehmann y Hudson (1977), en *Pinus sylvestris*, entre otros, encontraron que en los primeros estadios de descomposición la hojarasca tenía las mismas especies que la hoja antes de caer.

Estudios regionales de micoflora en hojarasca (Gamundi et al., 1977, 1979, 1983; Arambarri, 1981; Bunster Reyes, 1981 en *Pinus radiata* (Chile); Arambarri et al., 1981, 1984 en bosques de *Nothofagus* sp.; Godeas, 1983, 1987, en *Pinus taeda*) muestran la misma tendencia, observándose también una notable diferencia en la frecuencia de las especies encontradas.

Los trabajos de revisión más importantes son los de Last y Deighton (1962); Last y Warren (1972), sobre los organismos no parásitos de hojas; Millar (1974), desde la hoja viva hasta la hojarasca de coníferas; Pugh (1974), Dickinson (1976), especies fúngicas relacionadas con las superficies de las plantas superiores; Millar (1981), especialmente en *Pinus*. Sin embargo las tendencias y las líneas de trabajo fueron marcadas por los cinco simposios de filosfera que se han realizado y cuyas principales conclusiones fueron publicadas por Preece y Dickinson (1971); Dickinson y Preece (1976); Blakeman (1981); Fokkema y van den Heuvel (1986) y por último Andrews y Hirano (1991).

A continuación se citan los trabajos más importantes llevados a cabo desde 1955 hasta la fecha, relacionados con la filosfera de distintos hospedantes. Se menciona la metodología aplicada y los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

-1955, LAST estudió la variación estacional de *Sporobolomyces* sp. en hojas de cereales tales como trigo de invierno y

primavera y cebada de primavera en Broadbalk Field, Inglaterra.

El método que aplicó consiste en colocar hojas, durante un tiempo, sobre la superficie de cajas de Petri con PDA, a distintas temperaturas e incubarlas, expresando los resultados en número de colonias por superficie de hoja.

Obtuvo los siguientes resultados: luego que los entrenudos se alargan y el cultivo se torna denso, las variaciones en el número de *Sporobolomyces* sp. fueron similares en los tres cultivos en estudio. Las hojas tienen pocas colonias hasta la mitad de sus vidas y aumentan progresivamente hasta alcanzar un máximo después de su muerte.

Antes que los entrenudos se alarguen, mientras el cultivo es espaciado, el trigo de invierno tiene colonias de *Sporobolomyces* sp. en las hojas vivas pero el trigo de primavera y la cebada sólo tienen colonias en las hojas muertas.

Las hojas muertas en verano tienen el triple de colonias por unidad de área que las hojas muertas en invierno.

Ambas caras de las hojas tienen el mismo número de colonias pero la parte distal está más colonizada que la proximal. El número de colonias parecería estar relacionado con la humedad y los exudados.

En julio y agosto la presencia de *Tilletiopsis* sp. influye sobre *Sporobolomyces* sp. que disminuye en frecuencia.

Cladosporium sp. se lo aisló con regularidad de hojas muertas, principalmente en verano.

Se aislaron 20 cepas de *S. roseus* y 10 de *T. minor*.

El autor sugiere que a semejanza con las raíces y la rizosfera, las hojas tienen una filosfera con una microflora característica.

-1956, RUINEN estudió la relación de un pequeño helecho epífito, *Drymoglossum piloselloides* con su planta soporte; en Indonesia. Cuando el epífito se fijaba en ramas, troncos e incluso hojas; la planta soporte declinaba, los hongos de la rizosfera del helecho infectaban al soporte y causaban la muerte de la rama. Se estudiaron los organismos de la rizosfera y zonas adyacentes. En la rizosfera, los hongos predominaban sobre las bacterias, mientras que en la zona adyacente la flora bacteriana fue mayor. Los organismos observados fueron hongos comunes de suelo y parásitos leves.

Al estudiar más en detalle la zona de la hoja no cubierta por el epífito encontraron que tanto la población fúngica como la bacteriana y su cociente aumentaban con la edad de las hojas.

Las bacterias aisladas fueron *Mycoplasma rubra* y *Beijerinckia* sp.

Estas observaciones revelaron la existencia de un ambiente característico y condicionado por la hoja, que el autor denomina filosfera por analogía con la rizosfera. Simultáneamente Last (1955), introduce el mismo término al estudiar hongos de las hojas de los cereales.

A partir de este hallazgo el autor investiga hojas de árboles y arbustos de diferentes grupos ecológicos de Java,

Sumatra y Banka viendo que *Beijerinckia* sp. estaba presente en 192 casos sobre 196 estudiados.

El autor sugiere que los organismos de la filosfera se nutren de las sales, nutrientes y metabolitos que se excretan a través de la cutícula y que organismos como *Beijerinckia* sp., que es fijadora de N_2 , aportaría sustancias nitrogenadas que serían absorbidas directamente por las hojas o lavadas por la lluvia.

-1957, RISHBETH y MEREDITH mencionaron la existencia de poblaciones de esporas en la superficie de las acículas de *Pinus sylvestris* y *Pinus nigra* var. *calabrica* en el este de Anglia. Para aislarlos dejaron percolar agua a través de acículas recién recolectadas que inocularon en secciones del tallo de los pinos con o sin esterilización y sobre agar malta, incubaron y determinaron la existencia de *Fomes annosus*, *Cladosporium* sp., *Peniophora gigantea*, *Sclerophoma pithyophila*, *Ophionectria cylindrospora*.

Estas poblaciones de esporas fluctuaban con el tiempo probablemente debido a la pérdida de viabilidad o por ser lavadas por la lluvia.

-1958, HUDSON y WEBSTER estudiaron la sucesión fúngica en tallos de *Agropyron repens* luego de la floración y por un período de 19 meses. El objetivo fue comparar los resultados con los patrones de colonización hallados por Webster (1956 a y 1957) en *Dactylis glomerata*.

Las muestras se tomaron en Sheffield y Notts. La metodología aplicada fue: 1) incubación de tallos en cámara

húmeda, observación y determinación de las fructificaciones obtenidas, cuantificación en función de los distintos entrenudos a los que identificaron numéricamente; 2) aislamiento: utilizaron una modificación del aparato de lavado de Chesters (1948) para lavar trozos de la vaina de la hoja y del tallo que luego sembraron en CMA más antibióticos.

Los resultados que obtuvieron revelaron la existencia de una sucesión fúngica representada por varios grupos de hongos.

El grupo I estaba integrado por *C. herbarum*, *A. tenuis*, *E. purpurascens*, *Leptosphaeria microscopica*, *Pleospora vagans* y *Ramularia* sp. Estos hongos fructificaron en las hojas de los entrenudos inferiores al comienzo del verano; las hojas superiores, al decaer, también fueron colonizadas por esta asociación.

Al comparar cañas con y sin floración respecto a los hongos de este grupo no se encontraron diferencias; por lo tanto los cambios fisiológicos que determinan la floración no influyen en el patrón de distribución.

El grupo II estaba formado por *Mollisia palustris*, *Leptosphaeria nigrans*, *Ophiobolus herpotrichus* que fructificaron en entrenudos basales de primavera a otoño. *Pleospora trichostoma* fructificó mejor en entrenudos más altos.

El grupo III estaba integrado por *Tetraploa aristata* y *Helminthosporium hyalospermum*. Esta especie comenzaba a fructificar en los entrenudos basales al comienzo del

invierno y su frecuencia aumentaba al año siguiente.

El grupo IV estaba formado por *Mycosphaerella recucita* y *Selenophoma donacis*; este último más importante en los entrenudos superiores, en verano, después de la floración.

Por los métodos de aislamiento obtuvieron algunas diferencias respecto a los métodos de incubación en cámara húmeda. Por ejemplo *Pullularia pullulans* se lo aisló de hojas sin desplegar en casi todas las muestras desde mayo a setiembre, mientras que por el método de incubación aparece más restringido. *Acrospermum graminum* también varía con el método de aislamiento.

-1958 PUGH determinó la distribución de los hongos de la hojarasca de *Carex paniculata* en Nottinghamshire. La metodología consistió en identificar y aislar a partir de hojas esterilizadas superficialmente, las especies presentes en material coleccionado periódicamente. Las especies más comunes fueron *Cephalosporium acremonium*, *C. herbarum*, *Fusarium culmorum*, *Mucor* spp., *Penicillium* spp. y *Trichoderma viride*. Por otra parte las especies más frecuentemente observadas en hojarasca fueron *Metasphaeria cumana* y *Stysanus stemonites*.

En los meses de verano se obtuvieron mayor número de aislamientos coincidiendo esto con las mayores temperaturas y menor contenido de agua en los tejidos foliares.

-1961 RUINEN continuó con sus investigaciones de la filosfera ya iniciados en 1956, en esta oportunidad en Paramaribo, Surinam. Las muestras fueron tomadas de diversos lugares

tales como: sotobosque, árboles talados, cultivos de cacao, cítricos y otros.

La metodología empleada incluyó: I) Observación de cortes a mano alzada e improntas de hojas en collodion y II) Métodos de cultivo selectivos y sin fuente de nitrógeno.

Esta investigación reveló que en las zonas tropicales, húmedas el follaje está cubierto de microorganismos, como una capa continua, de grosor y composición de especies variable en cada cara de las hojas. Con la variación fisiológica que implica el envejecimiento, hay variaciones en la distribución y composición de los organismos de la filosfera que alcanzan su climax en la senescencia.

Se mencionan organismos oligonitrofilicos y fijadores de nitrógeno como *Beijerinckia* sp., *Azotobacter* sp., *Aerobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Spirillum* sp. También se citan levaduras, hongos, algas *Chlorophyceae* y *Cyanophyceae*, líquenes, musgos y protozoos. El autor analiza los factores que determinan la presencia de estos organismos.

-1962 MEREDITH determinó el patrón de colonización de hojas colapsadas de banana en St. Catherine, Kingston, Jamaica. Se tomaron muestras de hojas de distintas edades y diferentes sectores como vaina, pecíolo, nervadura y lámina. La metodología empleada fue incubación de hojas en cámara húmeda y mediciones del contenido de humedad de las muestras.

Los colonizadores primarios más frecuentes fueron *Deightonella torulosa*, *Gloeosporium musarum*, *Verticillium theobromae*, *Nigrospora* spp. y *Pyricularia musae*. A medida que

la hoja se seca la flora primaria es reemplazada por diferentes saprófitos

El autor analiza y discute el proceso de infección y esporulación de algunos colonizadores primarios, también considera la posibilidad de las hojas colapsadas de banana de constituirse en reservorios de inóculo de patógenos de esta planta.

-1962 KENDRICK Y BURGESS, estudiaron el proceso de descomposición de la hojarasca de *Pinus sylvestris* en Cheshire, Inglaterra. Utilizando el método de lavado de Harley y Waid, (1955) evaluaron los propágulos removibles, sembrando en medio de cultivo e incubando en cámara húmeda. Aplicaron el método de esterilización superficial con solución de cloruro de mercurio, incubando las hojas esterilizadas en cámara húmeda que observaron microscópicamente.

Los autores incluyeron en el estudio la hoja viva y los horizontes I, F1, F2 y II. El hongo con mayor frecuencia, en abril, en hoja viva fue *Coniosporium* sp., que disminuyó por el método de esterilización superficial, lo que implica que es un habitante del filoplano; en los casos en que se lo aisló de hojas esterilizadas podría deberse a que sus propágulos sobreviven en las cavidades subestomáticas. A pesar de sus frecuencias elevadas este hongo no coloniza la hoja extensamente (1 o 2 colonias por hoja).

Pullularia pullulans y *Fusicoccum bacillare* fueron los otros hongos de importancia, por su frecuencia, en hoja viva,

principalmente en verano y otoño y ausentes en invierno y primavera. Sugieren que fueron aislados de hojas senescentes, dado que luego de la caída de las hojas no se los aisló de hojas vivas. Estos dos hongos colonizan principalmente la superficie, dado que sus frecuencias decrecen por los métodos de esterilización superficial.

En el horizonte I. (hojarasca sin descomponer) se aisló *P. pullulans* en alta proporción, principalmente de la superficie de las hojas y se lo considera un saprófito primario colonizador de hojas recién caídas. También se aisló de este horizonte *Fusicoccum bacillare* pero principalmente de hojas esterilizadas. *Desmazierella acicola* también se lo aisló por esterilización superficial.

Por observación directa de las hojas detectan, en hoja viva, un micelio oscuro probablemente de *Pullularia* sp. o *Coniosporium* sp. También observan áreas decoloradas posiblemente por infección de *Lophodermium pinastri*.

En las hojas del horizonte L observan *Lophodermium pinastri*, hongo parásito que no se puede aislar en medios de cultivo artificiales (Jones, 1935), *Fusicoccum bacillare*, *Sclerophoma pithyophila*, *Verticicladium trifidum*, masas de hifas oscuras que podrían corresponder a *P. pullulans* y una red de hifas oscuras superficiales; posiblemente una nueva especie de *Hyphomycete*.

La observación de hojas vivas en otras épocas del año no dio diferencias significativas.

Para complementar los resultados de los métodos de cultivo

y de observación directa hacen cortes anatómicos de las hojas.

Incluyen y analizan datos climáticos tales como temperatura y precipitaciones.

En el análisis del horizonte orgánico consideran la influencia de la meiofauna.

Los autores consideran que las hojas del pino ejercen un efecto selectivo fuerte sobre los posibles colonizadores.

-1962 HUDSON, estudió la sucesión de micro-hongos en hojas senescentes de *Saccharum officinarum* durante un período de 14 meses en una plantación en el Departamento de Botánica de University College West Indies, Mona St. Andrew Jamaica.

La metodología incluyó: 1) Incubación de la parte basal de hojas de distintas edades en cámara húmeda, observación e identificación de las especies fúngicas, gráfico presencia/ausencia; 2) Discriminación de los hongos en función de los sectores de la hoja.

De acuerdo a los resultados que obtiene el autor propone un patrón de distribución fúngica integrado por tres grupos de hongos relacionados con los períodos de esporulación de los mismos y los estadios de maduración y decaimiento de las hojas.

El grupo I está integrado por *Leptosphaeria sacchari*, *Guignardia citricarpa*, *Cladosporium herbarum*, *Nigrospora sphaerica*, *Alternaria tenuis*, *Curvularia lunata*, *Helminthosporium sacchari*, *Pleocyta sacchari*, *Glomerella tucumanensis*, *Glomerella cingulata* y *Leptosphaeria michotii*.

El grupo II: *Periconiella echinochloae*, *Lacellinopsis sacchari*, *Pithomyces maydicus*, *Leptosphaeria eustomoides*, *Leptosphaeria* sp., *Papularia vinosa* y *Melanconium* sp.

El grupo III: *Lacellina graminicola*, *Spegazzinia tessarthra*, *Anthostomella tomicum*, *Anthostomella minima*, *Lophodermium arundinaceum*, *Tetraploa aristata*, *Didymosphaeria* sp., *Entosordaria deightonii*, *Apiospora camptospora*, *Metasphaeria* sp. y *Pleospora vagans*.

Con respecto a la colonización de la hoja completa, el autor comprueba que el ápice de la hoja es colonizado primero y luego el proceso sigue hacia la base de la misma.

-1963, RUINEN estudió las levaduras presentes en la filosfera de plantas tropicales. Las muestras fueron coleccionadas de árboles y arbustos del Jardín Botánico de Bogor (Indonesia) y de la Estación Experimental Agronómica de Paramaribo (Surinam) y en Adiopodoumé (Cote d'Ivoire).

Utilizó métodos de cultivo para aislar y purificar las cepas a las que luego sometió a test nutricionales, midió actividad de lipasa. Se aislaron 65 cepas pertenecientes a 22 especies de los géneros *Hansenula*, *Cryptococcus*, *Cándida*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Pullularia*. Predominaron las especies que no esporulan, no fermentan y son pigmentadas. Todas asimilaron peptona y sales de amonio. Muchas cepas producen mucilago en malta y en otros medios con azúcar, tienen actividad lipolítica extracelular. Esta actividad es importante para la degradación de la cutina e incluso de la cutícula, transformando así la filosfera en un ambiente

colonizable por microorganismos al aumentar la permeabilidad de la pared externa de la epidermis.

-1963, GREMMEN describió algunos hongos que habitan coníferas en Holanda. Entre ellos están *Chloroscypha seaveri* (discomicete) en hojas muertas de *Thuja plicata*, generalmente asociado con el patógeno *Didymascella thujina*; *Chloroscypha sabinae* en hojas muertas de *Juniperus virginiana*; *C. cryptomeriae* en *Cryptomeria japonica* y *Fabrella tsugae* en *Tsuga canadensis*. Este último citado por otro autor.

-1965, LAST Y DEIGHTON llevan a cabo uno de los primeros trabajos de revisión relacionados con la microflora no parásita de la superficie de hojas vivas. Se refieren a las técnicas de aislamiento, microorganismos aislados, factores que afectan la distribución, nutrición de los saprófitos y función de los colonizadores de la superficie.

-1965, DICKINSON determinó la microflora, tanto de hojas verdes y sanas como amarillentas, de un arbusto perenne, que crece en pantanos salinos, *Halimione portulacoides*. Estudió tres poblaciones de *H. portulacoides*, dos en Gibraltar y uno en Parkgate, Cheshire.

Los métodos empleados fueron: lavado de hojas con agua estéril y siembra en medio de cultivo de alicuotas de la suspensión para determinar propágulos presentes. Siembra de discos de hojas de 3mm, primero lavadas con agitación en agua más Tween 80 y luego con agua estéril solamente.

De los datos que obtiene el autor sugiere que la microflora del filoplano de *H. portulacoides* incluye tres grupos de

hongos. El primero constituido por los hongos transitorios, entre ellos las levaduras (creciendo activamente) y los propágulos fúngicos (depositados, pero que no han germinado). A los de este grupo se los aisló por el método de siembra de las suspensiones y no aparecen en los discos de hojas.

El segundo grupo representado principalmente por *Cladosporium herbarum*, serían los que crecen y esporulan activamente. Se los aisló por los dos métodos.

El tercer grupo incluye los que sólo crecen vegetativamente, *Ascochyta obionis* es el miembro más importante y sólo forma picnidios en hojas moribundas.

No hay patrones estacionales marcados pero a pesar de ello *C. herbarum* fue más común en el verano y *Ascochyta obionis* más frecuente en primavera y otoño. *A. obionis* estaba distribuido extensamente y posiblemente la marea estaba involucrada en el proceso de dispersión de las esporas. Es un hongo que permanece en forma vegetativa y fructifica en las hojas moribundas.

A medida que la hoja se torna senescente no hay una marcada reducción de los hongos del filoplano. Algunos hongos presentes en forma vegetativa en el filoplano comienzan a esporular en las hojas muertas y además aumenta la frecuencia de otros saprófitos. Entre estos últimos deben citarse especies de *Cephalosporium* y *Fusarium*.

Con respecto a organismos relacionados con el ambiente marino, tan particular, el autor menciona a especies de *Ascochyta* y *Dendryphiella*. El primero de ellos sólo citado

para *H. portulacoides* hasta la fecha del trabajo y el segundo, *D. salina*, también citado por Pugh (1962).

-1966, HOGG Y HUDSON estudiaron la sucesión fúngica en hojas vivas y muertas de *Fagus sylvatica*, en un bosque de Cambridge, durante tres años, desde el estadio de hojas sin desplegar, hojas maduras, hojas muertas y durante 18 meses luego de la caída de las mismas. El suelo tenía una hojarasca de 15cm y debajo había un suelo muy superficial y con alto porcentaje de carbonato de calcio (pH 6,8-7,2).

Los métodos utilizados fueron: incubación en cámara húmeda, método de caída de esporas, lavado y siembra de trozos de hojas (según Harley y Waid, 1955)

Los autores postularon tres patrones de distribución fúngica de acuerdo a sus periodos de esporulación: Grupo 1: *Discula quercina*, el estado conidial de *Gnomonia errabunda*, *Cladosporium herbarum*, el estado conidial de *Mycosphaerella tassiana*, *Aureobasidium pullulans*, el estado conidial de *Guignardia fagi*, *Alternaria tenuis* y *Botrytis cinerea*.

Grupo 2: *Discosia artocreas*, *Gnomonia errabunda*, *Mollisia acerina*, *Mycosphaerella punctiformis* y su estado conidial *Ramularia* sp. , *Guignardia fagi* y *Mycosphaerella tassiana*.

Grupo 3: *Polyscytalum fecundissimum*, *Spondylocyadiopsis cupulicola*, *Microthyrium microscopicum*, *Mollisia* sp., *Lachnella villosa*, *Helotium caudatum*, *Endophragma stemphylioides*, *E. catenulata*, *E. elliptica*, *E. laxa*, *Pistillaria pusilla*, *Chalara cylindrosperma* y *Doratomyces stemonitis*.

Las Sporobolomycetaceae representadas por *Sporobolomyces roseus*, *Bullera alba*, *Tilletiopsis minor* e *Itersonilia perplexans* se detectan por el método de caída de esporas, desde las hojas recién desplegadas y durante toda la experiencia. Las Mucorales se obtuvieron por los métodos de aislamiento, luego de la caída de las hojas, siendo el más frecuente *Mortierella rammaniana*.

La última fase en la sucesión ya mencionada estaría integrada por *M. rammaniana*, *Trichoderma viride* y *Penicillium* spp. y finalmente micelios de basidiomycetes como *Mycena* spp. y *Clitocybe nebularis* penetrarian en la hojarasca.

-1966 DICKINSON Y MORGAN-JONES fijan su objetivo en el estudio de la micoflora de *Halimione portulacoides*, en especial de algunos integrantes del Orden Sphaeropsidales. Las características de la planta en estudio como así también del lugar en que se llevó a cabo (Estrecho de Gibraltar) pueden consultarse en Dickinson, (1965).

En este trabajo toman muestras de: hojas amarillentas y desprendidas de la planta, hojas verdes y propágulos (semillas rodeadas por brácteas carnosas fusionadas).

Aplican método de lavado para las hojas según Dickinson (1965). Esterilización superficial y lavado para los propágulos. Siembran en agar-agua más antibiótico.

Por otra parte estudian raíces de plántulas y plantas adultas. Los siembran en agar extracto de suelo más antibióticos.

Los resultados que obtienen les permite inferir que

Ascochyta obiones, *Coniothyrium* obiones y *Camarosporium* obiones son los más abundantes.

-1967 DICKINSON lleva a cabo en Irlanda un estudio sistemático de la micoflora de las hojas de *Pisum sativum* durante todo el ciclo de la planta y en los primeros estadios de descomposición en el suelo. Para ello siembran las semillas y obtienen las plántulas para la experiencia.

Toman muestras cada 15 días y aplican los siguientes métodos: lavado de hojas y siembra de diferentes diluciones del agua de lavado; siembra de discos de hojas en agar-agua luego de lavar con Tween 80 y agua estéril repetidas veces; incubación de discos de hojas en cámara húmeda; improntas de la superficie foliar en esmalte de uñas, teñidas con fucsina ácida y montadas en lactofenol. Los hongos se tiñen de rojo, se pueden visualizar las células epidérmicas y estomas. Se hacen mediciones, conteo y dibujos de esporas y micelio al microscopio.

Obtienen los siguientes resultados: tanto las especies fúngicas como el número de sus propágulos tuvieron valores bajos durante la fase de activo crecimiento y senescencia de las plantas, pero aumentaron en la fase de descomposición.

Por los métodos de dilución y siembra de discos de hojas se obtuvieron resultados similares. Hacia la senescencia predominaron *Cladosporium* sp., *Aureobasidium* sp. y *Actinomyces*. En las hojas recién caídas *Alternaria* sp., *Stemphylium* sp. y *Cladosporium* sp. Otros saprófitos comunes que se aislaron de hojas muertas fueron *Epicoccum* sp. y

Fusarium avenaceum.

Las improntas de la superficie corroboraron los resultados anteriores. Las hojas jóvenes no presentan crecimiento hifal, que comienza con la senescencia. Se observaron principalmente células levaduriformes sobre las nervaduras y esporas germinadas de *Cladosporium* sp. y *Ascochyta* sp. en hojas senescentes, en hojas muertas se agregó *Stemphylium* sp. a los ya nombrados.

-1968 HUDSON Teniendo en cuenta que en los últimos estadios de colonización de la hoja viva intervienen organismos que son los primeros responsables de la descomposición de restos vegetales en el suelo es que no podemos dejar de mencionar a este autor, quien hace una amplia revisión de trabajos sobre ecología de hongos sobre restos vegetales en el suelo desde el año 1950 en adelante, refiriéndose a sustratos coprófilos, lignícolas, Monocotiledóneas tropicales, Monocotiledóneas templadas, Dicotiledóneas herbáceas, árboles deciduos, Coníferas y Pteridofitas iniciando sus investigaciones desde la planta en pie.

La sucesión en estiércol es singular, únicamente comparable con sucesión en compost y las diferentes fases son Phycomycetes, Ascomycetes y Fungi Imperfecti y finalmente Basidiomycetes. Para el resto de los sustratos, exceptuando los lignícolas, el autor propone un esquema general de sucesión algo más elaborado que el de Garret (1951).

Los primeros colonizadores en este esquema son parásitos, por ello pueden invadir tejidos vivos y adelantarse a muchos

saprófitos que probablemente están presentes como esporas en la superficie. Hay una gran variedad de parásitos, algunos hospedante específicos y otros hospedante restringidos. El comportamiento de los mismos es variado, algunos desaparecen con la muerte de la planta y otros persisten durante meses. En hojas de *Pinus* sp. se cita a *Coniosporium* spp.

El segundo grupo en la sucesión, en la mayoría de los sustratos, es el de los saprófitos primarios comunes integrado por *Cladosporium herbarum*, *Alternaria tenuis*, *Epicoccum nigrum*, *Aureobasidium pullulans* y *Botrytis cinerea*. En algunos sustratos están presentes todas las especies y en otros sólo una. En hierbas y malezas el segundo grupo está completo mientras que en hojas de *Pinus* sp. sólo se encuentra *Aureobasidium* sp. y en sustratos lignícolas sólo *Cladosporium herbarum*. En los trópicos *A. tenuis* es menos común y se agregan especies de *Nigrospora* sp. y *Curvularia* sp. Junto con este grupo en algunos sustratos se dan otros hongos más restringidos, como por ejemplo *Leptosphaeria microscopica* y *Pleospora vagans* en hierbas y varios Melanconiales sobre *Eucalyptus regnas*.

Westerdijk, (1949) propone el término de asociación para la combinación de especies de hongos sobre sustratos orgánicos; donde el sustrato sería selectivo de acuerdo a sus propiedades químicas y físicas.

Qué características tiene este grupo de hongos que le permite colonizar exitosamente el sustrato?

La habilidad para parasitar tejidos vivos les da ventajas

sobre los saprófitos estrictos. Distinguir entre parasitismo débil y saprofitismo es difícil. Por ejemplo *Botrytis cinerea* puede invadir tejidos sanos a los que mata a medida que sus hifas crecen.

Otra evidencia de actividad parasítica de este grupo de hongos la brinda Frankland (1966, 1992), quien menciona a *A. pullulans* como causante de lesiones en pecíolos de helechos.

Analizando los trabajos sobre filosfera parecería que la mayoría de estos hongos llegan a la superficie de un hospedante a través de esporas del aire y sólo se tornan activos vegetativamente cuando éste alcanza la senescencia.

Como saprófitos hay que analizar si son estrictamente "hongos del azúcar", o sea que su fuente de energía lo constituyen azúcares tales como hexosas, pentosas, compuestos de carbono más simples que celulosa y pectinas. También hay que analizar si tienen las restantes características de los "hongos del azúcar" como son el crecimiento miceliano abundante y la germinación rápida de las esporas. El hecho de persistir en restos vegetales sugiere que no sólo utilizan estas sustancias efímeras. La mayoría de los hongos saprófitos son celulolíticos menos los *Phycomycetes*. Siu, (1951) cita a *Cladosporium herbarum*, *Alternaria tenuis*, *Epicoccum nigrum* como poseedores de esta capacidad. (*A. pullulans* no se lo menciona). Se cita actividad celulolítica y pectinolítica para *Botrytis cinerea* (Reese y Levinson, 1952; Hancock, Miller y Lorbeer, 1964). *Chaetomium globosum* también se lo menciona como muy celulolítico (Reese, 1947).

Estas evidencias sugieren que los saprófitos primarios comunes no son estrictamente "hongos del azúcar" con excepción de *A. pullulans*. Este último y *Cladosporium herbarum* tienen muy poca o ninguna actividad celulolítica, esto los restringiría en su rol de colonizadores primarios.

El autor analiza el crecimiento de los colonizadores primarios en función de la humedad relativa, latencia de esporas, velocidad de crecimiento del tubo germinativo.

Los saprófitos primarios tendrían sobre otros la ventaja de que sus esporas germinan en condiciones de humedad no ideales (89%), si luego ésta aumenta la aprovechan para crecer.

Se puede resumir que en sustratos que contienen hidratos de carbono solubles, los saprófitos primarios tienden a dar mayor desarrollo lineal y peso seco de micelio. Esto les da una ventaja inicial en la colonización de un sustrato particular y la capacidad para utilizar celulosa les permite persistir luego que se consumen esos sustratos efímeros. *C. herbarum* y *A. pullulans* tienen poder celulolítico bajo y desaparecen por competencia con otros colonizadores. Este argumento no explica la situación de *A. tenuis* que es reemplazado a pesar de su crecimiento rápido y alto poder celulolítico; una posible hipótesis para explicar esta situación sería la competencia posterior por algún sustrato.

En *Fagus sylvatica*, el saprófito secundario *Endophragmia elliptica* tiene crecimiento lento y poder celulolítico relativamente bajo pudiendo utilizar celulosa tanto más

eficientemente que *A. tenuis*. La ventaja inicial de *A. tenuis* disminuye cuando la fuente de carbohidratos solubles se agota. Este podría ser uno de los factores que determina la sucesión.

El grupo de hongos que sigue a los saprófitos primarios es muy variable en cuanto a la composición de especies. Son casi todos Ascomycetes y Fungi Imperfecti y no se dan las asociaciones mencionadas para el grupo anterior.

Denominarlos saprófitos secundarios no es totalmente correcto, ya que en la mayoría de los casos no está determinado exactamente el momento de la colonización. En algunos casos se ha demostrado que colonizan junto con los saprófitos primarios.

En algunas sucesiones, generalmente en los últimos estadios aparecen Basidiomycetes. En el caso de árboles de hojas caducas aparecen cuando la hojarasca está bastante descompuesta, compactada y con alto contenido de humedad. En sustratos como peciolo de helecho, conos de *Fagus sylvatica* aparecen antes y en los lignícolas son los primeros colonizadores.

Asociados con los Basidiomycetes aparecen algunas Mucorales, *Mortierella ramanniana*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium* spp. y *Trichoderma* spp. Estos son hongos de suelo y llegan a los restos vegetales creciendo hacia arriba a través de la materia orgánica. La función de ellos parecería de "hongos del azúcar" secundarios que crecen asociados con hongos que descomponen celulosa y lignina.

-1970 LAMB y BROWN determinaron la microflora fúngica residente y transitoria de la superficie de las hojas de *Paspalum dilatatum*, *Salix babylonica* y *Eucalyptus stellulata*, hierba perenne, árbol de hoja caduca y árbol de hoja perenne respectivamente.

La metodología usada tiende a discriminar los saprófitos residentes de los transitorios y consiste en: a) Impronta de hojas según Potter, (1910); b) Método de caída de esporas según Last, (1955); c) Observación de hojas clarificadas y teñidas según Shipton y Brown, (1962); d) Determinación de la microflora del aire.

Muestrearon semanalmente durante ocho semanas en verano y otoño, más un muestreo adicional en primavera e invierno para determinar la influencia de los cambios estacionales.

Los resultados que obtuvieron por el método de impronta de hoja es que la densidad de colonias aisladas es mayor en *P. dilatatum* y menor en *E. stellulata*. Con respecto al número de especies fúngicas es mayor en *P. dilatatum* (19) y menor en *S. babylonica* (10).

Las especies con mayor frecuencia en *E. stellulata* fueron *A. pullulans*, *Didiodendron* sp. y *Penicillium spinulosum*. En *Paspalum dilatatum* fueron *Sporobolomyces roseus*, *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus versicolor* y *Pithomyces chartarum*. En *Salix babylonica* fueron *A. tenuis*, *Rodotorula glutinis* y *Epicoccum nigrum*.

El método de observación directa lo aplicaron sólo en *P. dilatatum* e identificaron *Alternaria* sp., *Botrytis* sp.,

Helminthosporium sp. y *Verticillium* sp. aparentemente como patógenos dentro de los tejidos y *Sporobolomyces* sp y *Penicillium* sp. en la superficie de la hoja.

Con respecto a la microflora del aire observaron que el número de propágulos fúngicos permanece constante con la altura mientras que el número de colonias de bacterias disminuyen con la altura. En las hojas de *E. stellulata* ocurre algo similar, la microflora no se ve afectada por la altura, mientras que las bacterias disminuyen con la altura.

Con respecto a los efectos estacionales sobre la microflora de *P. dilatatum*, testeado por el método de impronta de las hojas, el número de colonias permaneció constante, salvo para *Cladosporium herbarum* que predominó en julio.

-1971 RUSCOE determinó los colonizadores del filopiano y los endofitos de *Nothofagus truncata* en hojas jóvenes, maduras, senescentes y muertas. La especie arbórea crece en tierras bajas de temperatura benigna a cálida de Nueva Zelanda.

Realizó muestreos estacionales y aplicó los siguientes métodos: 1) Observación directa de hojas teñidas con trypan blue (Boedijn, 1956), estimación del número de colonias y porcentaje de cobertura; 2) Método de lavado de Kendrik y Burges, (1962), adaptado de Harley y Waid, (1955); 3) Incubación en cámara húmeda de hojas enteras a 25°C; 4) Método de caída de esporas tanto para la cara abaxial como adaxial; 5) Esterilización superficial con cloruro de mercurio y alcohol industrial (Hering, 1965) y siembran en

PDA o incubación en cámara húmeda; 6) Método para colonias fumaginoides (Langeron y Vanbreuseghem, 1965).

En el momento que las hojas de *N. truncata* llegaron al suelo estaban colonizadas por una variedad de hongos parásitos y saprófitos. La colonización tanto superficial como interna se iniciaba en la hoja joven.

El autor los clasificó de acuerdo al esquema de Hudson, (1968). Los colonizadores iniciales son parásitos como *Pestalotia funerea*, *Tubercularia* sp., *Stachylidium* sp. y un ascomycete no determinado. Una especie de *Phoma* la aisló en estado vegetativo antes de la senescencia de las hojas. El grupo que sigue es el de los saprófitos primarios, *C. herbarum*, *A. tenuis*, *E. nigrum* y *A. pullulans*. Algunos de éstos incluso se los aisló de estadios muy tempranos de las hojas.

En el momento de la caída de las hojas se agregaron los saprófitos secundarios como *Pachybasium hamatum*, *Discula* (microsperma?), *Penicillium spinulosum*, *P. thomii*, *Hansfordia ovalispora* y *Rhodesia subtectata*.

El autor observó una tendencia hacia la epifilia para las colonias fumaginoides mientras que las colonias hifales hialinas resultaron hipófilas.

La actividad fúngica fue mayor en verano y el autor lo atribuye a la temperatura ambiente elevada.

-1971 PUGH Y BUCKLEY Eligieron *Acer pseudoplatanus*, "sycamore", para estudiar la colonización desde la apertura de las yemas hasta la desintegración de las hojas.

Muestrearon mensualmente en Winkburn, Nottinghamshire y aplicaron los siguientes métodos: 1) Método de caída de esporas; 2) Clarificación de hojas con hidrato de cloral (Shipton y Brown, 1962), tinción con azul de algodón al lactofenol y observación de las estructuras fúngicas y la anatomía foliar; 3) Observación con MEB; 4) Métodos de cultivo con y sin esterilización superficial; 5) Digestión de hojas, previamente esterilizadas superficialmente con pectinasa hasta que queden sólo las venas, lavado y siembra en PDA; 6) Exposición a radiación ultra violeta de 2537A de longitud de onda, de suspensiones de los hongos aislados de la superficie de las hojas.

Los resultados obtenidos por el método de caída de esporas revelaron que *Sporobolomyces* sp. se encuentra predominantemente en la cara superior de las hojas y a lo largo de las venas con un aumento estacional correspondiente al verano. En la cara inferior la mayor frecuencia fue para *Cladosporium herbarum*, mientras que *A. pullulans* se lo aisló de ambas caras con baja frecuencia.

La clarificación de las hojas permitió ver la disposición de las células fúngicas paralela al eje de las venas. *A. pullulans* resultó significativamente asociado a las venas. También pudieron seguir la evolución de las colonias de los diferentes hongos a través del año. *A. pullulans* se inició como células individuales, luego en manojos de células de paredes gruesas embebidas en mucílago y a partir de julio dio estructuras fumaginoides, clamidosporas y a veces formó

microesclerocios.

La germinación de *C. herbarum* fue observada en julio, acompañada de colonias maduras del mismo. Esta especie fue aislada durante todo el año, pero en febrero al caer las hojas la encontraron en forma de microesclerocios a lo largo de las venas junto a *Mycosphaerella* spp.

Epicoccum nigrum apareció en julio y su frecuencia aumentó hasta la caída de las hojas. También se observaron esporas de *Alternaria* sp., granos de polen y células algales.

Las observaciones con MEB confirmaron la relación de los hongos con las venas, además encontraron diferencias topográficas entre las dos superficies foliares, siendo la superior lisa mientras que la inferior posee estomas, venas que sobresalen y muchas excrescencias cerosas cristalinas. Las estructuras fúngicas rara vez se observaron en la cara inferior.

Los resultados del método de lavado de hojas y cultivo los expresaron como frecuencia porcentual y se refieren al número de veces que se aisló una especie de los 50 trocitos de hojas.

Aureobasidium sp. se lo aisló desde la apertura de las yemas hasta la caída de las hojas y con frecuencias constantes. *Cladosporium* sp. tuvo frecuencias altas de julio en adelante. *Epicoccum* sp. presentó frecuencias altas a partir de julio, siendo su máxima frecuencia luego de la caída de las hojas. *Alternaria* spp. y *Botrytis cinerea* se los aisló esporádicamente y con frecuencias bajas.

Por el método de esterilización superficial aislaron *Aureobasidium* sp., luego de tres semanas de la apertura de las yemas, siendo la mayor frecuencia en junio, pasando luego a 20% de las hojas examinadas. La frecuencia de *Cladosporium* sp. en junio fue baja y a partir de setiembre alcanzó el 20%. *Epicoccum* sp., *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp. se los aisló de hojas senescentes a partir de setiembre y aumentaron luego de la caída de las hojas.

Por el método de digestión de hojas aislaron *Aureobasidium* sp. en la misma proporción que de las hojas esterilizadas superficialmente, mientras que *Cladosporium* sp. también lo encontraron en las venas, aunque no estaba restringido a ese tejido.

Por el método de radiación UV las esporas de *Cephalosporium* sp. y *Aureobasidium* sp. disminuyeron en la viabilidad luego de 5' de exposición y luego de 10' fue rara la supervivencia. La mayoría de las esporas de *Cladosporium* sp. se murieron luego de 10', pero algunas sobrevivieron a 35' de exposición. *Alternaria* sp. y *Epicoccum* sp. sobrevivieron a niveles altos de exposición, lo mismo que las clamidosporas y microesclerocios de *Aureobasidium* sp. Células aisladas de *Sporobolomyces* sp. murieron a los 5', mientras que sus colonias sobrevivieron a 35' de exposición.

-1971 MENNA estudió la micoflora de plantas usadas para pastoreo en Nueva Zelandia. Motivó esta investigación una enfermedad del ganado (eczema facial) provocada por *Pithomyces chartarum*. Quiso evaluar el tipo y la cantidad de

hongos que el ganado ingiere junto con el pasto, en relación con la estación y la planta hospedante.

La metodología que se aplicó fue cultivo de hojas lavadas en dos medios de cultivo diferentes, uno para hongos según Menna y Parle (1970) y otro para levaduras según Menna (1959a).

Estudió la micoflora de *Lolium perenne* (ryegrass), *Trifolium repens* y *Festuca arundinacea*. Las dos primeras se muestrearon semanalmente durante dos años, ya que son las más importantes en el pastizal. También tomaron muestras de hojarasca cuando había disponible. *F. arundinacea* se muestreó mensualmente durante 13 meses.

Los patrones de la población mostraron que el número de hongos y levaduras por gramo de hojas fue mayor en verano y otoño, mayor en hojarasca y hojas senescentes que en hojas verdes y mayor en *Lolium perenne* que en *Trifolium repens* o *Festuca arundinacea*.

Los hongos aislados de las tres especies de plantas fueron en orden decreciente: formas picnidiales, *Cephalosporium* spp., *Cladosporium herbarum*, *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Rhynchosporium* spp., *Verticillium* spp., *Myrothecium* spp., *Pithomyces chartarum* y *Metarrhizium anisopliae*.

Las levaduras dominantes fueron *Sporobolomyces* sp. y *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus laurentii* y *Torulopsis ingeniosa*. No encontraron diferencias cualitativas entre la micoflora de la hojarasca, hojas senescentes y hojas verdes.

La variación estacional fue: *Cephalosporium* spp, C.

herbarum, Colletotrichum spp., Myrothecium spp. y Pithomyces chartarum se aislaron con mayor frecuencia en verano y otoño; Fusarium nivale y Rhynchosporium sp. predominaron en invierno y primavera; las formas picnidiales dominaron en primavera; las levaduras pigmentadas Sporobolomyces sp. y Rhodotorula spp. en verano y otoño mientras que Torulopsis ingeniosa predominó en invierno y primavera.

Los hongos tóxicos de las pasturas fueron un porcentaje pequeño de la flora. En 1967 hubo pocos casos de eczema facial en el ganado, en Hamilton y sobre 4000 hongos aislados hubo 1 sólo de P. chartarum. Al año siguiente hubo un brote severo de la enfermedad y P. chartarum constituyó el 1% de los aislamientos realizados en la estación. Estos datos muestran que es necesario investigar los organismos con frecuencias muy bajas. Otros géneros de hongos que producen sustancias tóxicas para mamíferos y que han sido aislados regularmente en pastizales en Nueva Zelandia fueron Fusarium sp. y Myrothecium sp.

-1971 SINHA Estudió los microorganismos de las hojas de cuatro especies de Solanáceas, Capsicum annum, Solanum melongena, Solanum tuberosum y Lycopersicum esculentum, en relación a cambios meteorológicos del ambiente y distintos períodos de crecimiento de la planta. El trabajo se realizó en la India. Se aplicó método de lavado para aislar hongos saprófitos, actinomicetes y bacterias. Muestreó hojas jóvenes maduras y viejas en diciembre, enero y marzo. El agua del lavado la sembró en tres medios de cultivo

Los resultados revelaron que *Capsicum annuum* tiene el mayor número de microorganismos. Se destacaron las especies comunes a los cuatro hospedantes. Se mencionan especies asociadas a algún hospedante en particular.

Los resultados revelaron la influencia de la temperatura atmosférica, humedad y lluvia en los microorganismos de la superficie de la hoja. El estado de madurez de la hoja fue otro de los factores que influyó en la composición florística de los microorganismos.

El número de organismos aumentó con la edad de la hoja. Esto podría reflejar el aumento gradual de la deposición de esporas provenientes del aire o debido a la reproducción de los microorganismos en el filoplano de las hojas viejas.

Comparando los microorganismos aislados con las esporas presentes en la atmósfera encontraron 12 especies que se dan en el filoplano pero no en la atmósfera.

La mayoría de los que se encontraron en la atmósfera también se los aisló del filoplano.

-1971 KLINCARE, KRESLINA Y MISHKE. Parten de la hipótesis de que los microorganismos epífitos están en íntimo contacto con la planta durante el ciclo vegetativo de la misma; los productos metabólicos que producen podrían penetrar en los tejidos de la planta e influir en su metabolismo. Si la fuente de inóculo de la planta es la semilla, al modificar la microflora de la semilla se modificaría el complejo de microorganismos tanto de la raíz como de la parte aérea. Con el objeto de verificar esta premisa los autores aislaron

microorganismos epífitos a partir de tallos, hojas, espigas y raíces. Prepararon diversas suspensiones y cultivos en medio líquido. Inocularon semillas con diversos microorganismos y luego las hicieron germinar en cámara húmeda. Analizaron el número de semillas germinadas y midieron las distintas partes de las plántulas. Además estudiaron el sobrenadante de cultivos líquidos, de hongos que tienen efecto estimulante.

Las plantas usadas fueron: *Hordeum sativum*, *Avena sativa*, *Becale* sp., *Medicago sativa*, *Lupinus* sp. y *Beta* sp. Los microorganismos fueron *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Chromobacterium* sp., *Bacterium* sp., *Sarcina* sp., algunas levaduras y Actinomycetes.

El tratamiento de las semillas con sustancias como Mercuran, TMTD y estreptomycin bajó el número de microorganismos epífitos en función de cada sustancia y la duración del tratamiento.

El agregado de sustancias como $MnSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$ aumentó el número de microorganismos en la superficie, en especial de bacterias pigmentadas.

Comprobaron que algunos representantes de la microflora epífita eran estimulantes activos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Tal fue el caso de *Pseudobacterium* 392, *Pseudomonas* 399 y 201 y *Sarcina* 291.

-1971 HUDSON hizo una revisión de los trabajos sobre saprófitos primarios tanto comunes como restringidos, refiriéndose a las potencialidades fisiológicas de los mismos: celulolíticos, pectinolíticos etc. Analizó el efecto

del agregado de fuente de nitrógeno, para ello sumergió hojas de manzano en urea al 5% a mediados de noviembre, poco después de la caída de las hojas y las colocó en el suelo bajo el árbol. A partir de enero retiró las hojas y las incubó en cámara húmeda para determinar hongos esporulantes.

Los hongos más comunes fueron *C. herbarum*, *E. nigrum*, *A. tenuis* y *Phoma* sp. No se aisló *B. cinerea* y la técnica empleada no fue apropiada para detectar *A. pullulans*.

El tratamiento con urea mantuvo alta la frecuencia de *C. herbarum*, aumentó la frecuencia de *E. nigrum* y *Phoma* sp. y bajó la frecuencia de *A. tenuis*. También hubo un aumento perceptible en *Mucor* spp, *Fusarium* spp. y *Gonatobotrys simplex*.

Por otra parte cortó discos de 1cm de diámetro de hojas tratadas y no tratadas, las lavó con H₂O estéril y sembró el agua. De los datos obtenidos se infiere que hay un aumento total de esporas viables en las hojas tratadas, menos pronunciado en la 3ra semana respecto a la 1ra y 7ma.

Concluyó que la urea tiene distintos efectos sobre los distintos hongos y el nitrógeno disponible es uno de los determinantes de la colonización.

El agregado de nitrógeno para *A. pullulans*, que es escasamente celulolítico, lo estimuló para utilizar más rápidamente los carbohidratos simples presentes y luego desaparecer, mientras que los hongos celulolíticos persistieron y aumentaron ya que el nitrógeno disponible los capacitó para usar más celulosa.

-1972a, NORSE Investigó la influencia de cambios cuantitativos o cualitativos en las poblaciones de hongos epífitos de las hojas verdes del tabaco sobre el desarrollo del patógeno *Alternaria longipes*. Durante dos años muestreó dos niveles en el tallo a intervalos de 14 días en el primer año y 7 días en el siguiente.

Los métodos que aplicó fueron: 1) Impronta de las hojas con celloidin, observación en las mismas de colonias fúngicas y granos de polen al microscopio; 2) Método de caída de esporas (Last, 1955) con conteo y aislamiento de las colonias obtenidas.

Los hongos aislados fueron testeados para ver su efecto en el crecimiento de *A. longipes*, en presencia de: a) cultivos de los hongos aislados, b) del sobrenadante de cultivos líquidos de las cepas obtenidas, c) antagonismo

Por los resultados obtenidos concluyó que el método de caída de esporas sobrestima el número de hongos residentes esporulados en hojas jóvenes y los subestima en hojas viejas.

Antes que termine la expansión de la hoja y antes de la senescencia ocurre el crecimiento micelial extenso y la formación de estructuras reproductivas, utilizando los granos de polen para el crecimiento de los epífitos.

Algunos hongos inhibieron el crecimiento del tubo germinativo y/o el crecimiento miceliano de *A. longipes*.

-1972, IVORY Estudió el proceso de infección en las hojas de *Pinus radiata* en Kenya por *Scirrhia pini*. Observó la germinación de los conidios tanto en medio de cultivo, como

en las hojas del hospedante, describió la penetración y el desarrollo dentro de los tejidos.

Aisló 36 hongos y bacterias de la filosfera. Los componentes más importantes fueron: *A. pullulans*, *Pestalotiopsis monochaetioides*, *Truncatella hartigii*?, *Alternaria tenuissima*, *Aureobasidium* sp., hongo estéril G, Bacteria, *Cladosporium tenuissimum*, *Coniothyrium* spp., *Coremiella cubispora*, *Epicoccum nigrum*, *Nigrospora sphaerica*, *Rhodotorula glutinis* y *Sclerophoma pythiophila*.

Entre los componentes de menor importancia figuran: *Bacterium* A, *Penicillium* sp., *Periconia minutissima*, *Chaetomium funicula*, *Penicillium notatum*, *P. oxalicum*, *Cerebella andropogonis*, *Cephalosporium* spp., *Chaetomella* sp., *Gliomastix* sp., *Leptosphaerulina trifolii*, *Penicillium spinulosum*, *Periconia* sp., *Phoma* sp., *Pithomyces chartarum*, *Rhodotorula* sp.

Investigó el efecto antagónico de los habitantes de la filosfera respecto al patógeno y concluyó que estos organismos no tienen un efecto significativo sobre el desarrollo de la enfermedad.

-1972, LAST Y WARREN hicieron una revisión de los trabajos relacionados con microorganismos no parásitos que colonizan hojas verdes. Se refirieron a la metodología utilizada, microorganismos presentes, sucesión, ambiente físico y químico, interacción entre organismos y fijación de nitrógeno.

Los organismos encontrados fueron: 1) Hyphomycetes y

Ascomycetes, particularmente miembros de Micropeltaceae y Chaetothyriaceae (Last y Deighton, 1965); 2) Algas Chlorophyceae y Cyanophyceae; 3) Liqueños en los trópicos húmedos (Ruinen, 1961). Pero principalmente las bacterias y hongos levaduriformes, que incluyen miembros de Cryptococcaceae, Sporobolomycetaceae, *Aureobasidium* sp. y *Candida* sp., fueron los colonizadores de la superficie de la hoja. Los Actinomycetes fueron raros.

Mencionan a bacterias epífitas no parásitas como *Erwinia herbicola*, *Aerobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Flavobacterium* sp., *Lactobacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. Ruinen (1961) citó *Beijerinckia* spp. como bacterias fijadoras de nitrógeno. Entre las levaduras se encuentran miembros de Cryptococcaceae: *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp. y *Torulopsis* spp.; de las Sporobolomycetaceae: *Sporobolomyces* spp. y *Tilletiopsis* spp. y el hongo levaduriforme *A. pullulans*.

-1972b, NORSE Determinó la micoflora endofítica de las hojas del tabaco, variedad Toleza, tomando muestras semanalmente a dos niveles sobre el tallo. Aplicó método de esterilización superficial con solución etanólica de cloruro de mercurio (0,1%).

Aisló *Colletotrichum capsici*, *Alternaria longipes*, *Chaetomium cochliodes*, *A. alternata*, *Phoma* sp., *Cercospora nicotianae*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Curvularia verruculosa*, *Glomerella cingulata*, *Mycosphaerella* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phyllosticta nicotianae*.

Evaluó el efecto de la disposición a diferentes alturas sobre la planta (edad de las hojas) y encontró que *Ch. cochliodes* se aisló sólo en hojas jóvenes y al comienzo de la estación de crecimiento mientras que *C. capsici* aumentó con la edad de la hoja y en las senescentes alcanzó niveles muy altos. Este último hongo lo cultivó in vitro y con sus conidios preparó una suspensión con la que inoculó plantas maduras y jóvenes. No obtuvo síntomas. De los hongos aislados sólo *Cercospora nicotianae* y *Alternaria longipes* dieron síntomas visibles. Estos dos hongos y *Phyllosticta nicotianae* son patógenos conocidos de tabaco, pero en la variedad Toleza, usada en este ensayo, sólo se desarrolla en tejidos dañados por otros hongos o agentes físicos o mecánicos. *Cochliobolus heterostrophus* es parásito de maíz y *Colletotrichum capsici* es parásito débil de varias Solanáceas, pero parece que bajo ciertas condiciones, tanto estos hongos como otros no patógenos de tabaco pueden penetrar tejidos sanos de tabaco y permanecer en dormición o establecer una relación patogénica latente. Luego podrían colonizar la hoja en la senescencia o en la hojarasca.

Seis de los géneros aislados de hojas de tabaco tienen especies que producen micotoxinas que son altamente tóxicos para mamíferos. Plantea el interrogante de si seis de los endofitos no patógenos podrían constituir un peligro para la salud.

-1973, BERNSTEIN, HOWARD y CARROLL propusieron una técnica de

fluorescencia para observar los organismos de la superficie de *Pseudotsuga menziesii*. Colocaron las hojas sobre un portaobjetos y tiñeron 5 minutos con solución de primulin (colorante fluorescente) al 1% y observaron al microscopio con epi-iluminación con fuente de luz de mercurio.

También observaron con MEB hojas fijadas en FAA con 5% de glicerol.

Los resultados revelaron que la hoja en si misma y las algas epifitas fluorescen rojo, debido a la fluorescencia primaria de la clorofila; los hongos hialinos, los actinomicetes y las paredes celulares de las algas epifitas fluorescen amarillo verdoso debido a la fluorescencia secundaria de la primulina. Por último las células epifitas que no fluorescen se observaron oscuras.

Los autores concluyeron que el MEB provee mayor información sobre la topografía de la superficie de la hoja, mientras que la técnica de fluorescencia resultó mejor para identificar microorganismos de la superficie o para estimar en forma rápida y económica la cobertura microbiana de la hoja.

-1974 DIEM hizo una estimación de la micoflora de la planta de la cebada en Tomblaine, Francia.

Tomó muestras periódicamente durante 2-3 semanas y aplicó la siguiente metodología: 1) Lavado con Tween 80 y siembra de distintas diluciones del agua de lavado; 2) Impronta de la cara superior de la hoja en agar-agua 1%, estimación de colonias fúngicas y granos de polen; 3) Determinación de la influencia de la humedad sobre el crecimiento de C.

cladosporioides en la superficie de la hoja. Para ello preparó suspensiones de *C. cladosporioides* y con ellas pulverizó plántulas de cebada, incubando durante 4 días y determinando la población de *C. cladosporioides* por alguno de los métodos iniciales.

La frecuencia de las colonias fúngicas resultó 0,1 a 17,2 por cm² de hoja; el área ocupada por cada colonia fue alrededor de 0,05 mm²; la superficie de colonización varió entre 0,002 y 0,774 mm²/cm². El rango de colonizadores se limitó predominantemente a *Cladosporium* spp. La existencia de poblaciones activas coincidió con períodos de liberación masiva de polen.

-1974 GODFREY Estudió la micoflora del filoplano de *Pteridium aquilinum* (Pteridophyta) durante dos estaciones y evaluó el efecto de sustancias lixiviadas de las hojas vivas sobre el hongo *Botrytis cinerea*. El lugar del muestreo fue en Hayes Common Kent (Londres)

Los métodos aplicados fueron: 1) Método de lavado de Hogg y Hudson, (1966); 2) Extracción de sustancias lixiviadas según Kovaks y Szeoke (1956), Preparación de distintas concentraciones de las mismas; 3) Preparación de distintas concentraciones de suspensiones de conidios de *Botrytis cinerea*; 4) Enfrentamiento sobre portaobjetos de lixiviados y conidios. Se contaron y midieron tubos germinativos; 5) Observación directa de las pinas al microscopio.

Los resultados revelaron que *A. pullulans*, *C. herbarum* y *B. cinerea* estaban presentes desde mayo y junio hasta octubre

con frecuencias altas; en noviembre *A. pullulans* siguió con frecuencia alta pero las otras especies decrecieron. *A. alternata* y *E. purpurascens* fueron importantes hacia el final de la estación. También se aislaron otras especies esporádicamente.

El patrón de colonización fue similar en los dos años de muestreo. En general se observó aumento en el número de especies a medida que maduraron las hojas.

Con respecto al efecto de los lixiviados se vio que el porcentaje de germinación no tuvo diferencias significativas de los controles respecto de los tratados pero los tubos germinativos fueron significativamente mayores que en el control.

La observación directa de las pinas reveló que en mayo y setiembre había conidios, microesclerocios e hifas fúngicas en la superficie de la fronde. *A. pullulans* y *C. herbarum* ocupaban las depresiones de la pina y las nervaduras.

-1974 SHERWOOD Y CARROLL Estudiaron la sucesión fúngica en hojas y ramas jóvenes (4cm de diámetro) de *Pseudotsuga menziesii* en Oregon. Tomaron muestras de árboles de distintas edades y a tres niveles distintos sobre el suelo. Paralelamente hicieron un estudio de la biomasa del árbol.

La metodología aplicada consistió en la observación al microscopio de ambas caras de las hojas, ramas, nudos y escamas e identificación de los hongos presentes. Las fumaginas se cultivaron en agar agua para su identificación, no así otros hongos presentes que los autores consideraron

que no crecerían en medios de cultivo. Los que no se reconocieron al microscopio se descartaron (por ejemplo micelios estériles, algas y bacterias)

Además estudiaron las características del sustrato viendo que la cara superior recibe más luz y agua que la inferior, esta última tiene estomas que no hay en la superior y que los nudos y escamas son muy resinosos.

Los organismos que encontraron en las hojas fueron: *Atichia* sp. en la cara superior de hojas de 5-8 años; *Schizothyrium* sp. (Dothideales) en la cara inferior de hojas de 2 años y en las hojas más viejas se encontraron hasta 100 pseudotecios de este último hongo nombrado. Algunas ramas tuvieron 100% de hojas infectadas. *Phaeocryptopus gaeumanii* se vio ocasionalmente en árboles de edad variada y en hojas de 4-5 años.

Epipolaeum pseudotsugae produce caída de hojas en árboles jóvenes pero estuvo ausente en árboles viejos.

También observaron *A. pullulans* en la cara superior de las hojas.

Las poblaciones de hongos de las hojas y ramas de *Pseudotsuga menziesii* resultó diferente de los resultados hallados por otros autores en otros árboles de zonas templadas.

-1974, WATSON, McCLURKIN Y HUNEYCUTT Se fijaron como objetivo analizar la sucesión fúngica en la hojarasca de *P. taeda*, *Quercus marilandica* y otras especies de madera dura, desde la hoja viva hasta el horizonte de humus, en un bosque cerca de

Oxford en Mississippi norte. Tomaron muestras 2 veces en cada estación y de cada tipo: A (hojas vivas); L (hojas recién caídas); F1; F2 y H.

Usaron los siguientes métodos: 1) Método de lavado según Kendrick y Burges (1962), Hogg y Hudson (1966); 2) Esterilización superficial con etanol 95%; 3) Observación directa según Kendrick y Burges (1962).

Aislaron más de 70 especies de pino y roble pero sólo 13 son importantes por sus frecuencias en la sucesión. Hay 13 especies que sólo se aislaron de la hojarasca de pino, 10 sólo de roble y 49 son comunes a ambos sustratos.

Encontraron variaciones en las frecuencias de primavera a verano y otoño pero ninguna especie importante aparece restringida a una estación.

Nigrospora sphaerica y *Pestalotia olivaceae* parecen ser colonizadores internos de la hoja.

Por incubación en cámara húmeda aislaron algunas especies que no se obtuvieron por los métodos de cultivo.

Con respecto al horizonte A, aislaron 38 especies, 7 exclusivas de pino, 11 de roble y 20 comunes. *Alternaria tenuis*, *Cladosporium herbarum* y *Epicoccum nigrum* parecen pertenecer a la superficie foliar, mientras que *Nigrospora sphaerica* y *Pestalotia olivacea* colonizan el interior de la hoja. *Lophodermium pinastri* se lo aisló exclusivamente de pino.

-1974, MILLAR Hizo una revisión bibliográfica sobre descomposición de hojarasca de coníferas desde la hoja viva,

refiriéndose a la naturaleza del sustrato, cantidad y patrones de caída de hojas, estadios de la descomposición, sucesión de los organismos de la microflora y microfauna, cambios químicos durante el proceso de descomposición y velocidad de la misma.

-1974, PUGH Hizo una revisión bibliográfica sobre hongos terrestres que abarcó la ecología, biología, clasificación taxonómica y biológica y fisiología. En el análisis de la ecología de los hongos consideró los hongos presentes en el suelo y en diferentes partes de las plantas tales como semillas, raíces, yemas, hojas y las metodologías utilizadas.

En la biología de los hongos describió estructuras vegetativas, reproductivas, mecanismos de dispersión, estructuras de resistencia, dormición, micostasis, destino final de las esporas e hifas y hongos predadores.

En la clasificación biológica tuvo en cuenta los requerimientos nutricionales de los hongos.

La fisiología fue analizada teniendo en cuenta coeficiente C/N, metabolitos fúngicos, efecto de la radiación y temperatura.

-1974, GOURBIÈRE a y b Estudió la microflora de las acículas de *Abies alba* en hoja viva y también en la hojarasca. En esta última discriminó entre habitantes del filoplano y endofitos. El material provino de Tarentaise, Loire.

-1975, GOURBIÈRE Observó la microflora epifila con MEB. Utilizó el método de lavado según Dickinson, (1967). Aisló 23 especies, pertenecientes a los géneros *Tripaspermum*,

Aureobasidium, *Dendrodochium* y *Polyscytalina*.

Determinó la evolución de la micoflora con la vida de las acículas (9 años). Al comparar la micoflora de las acículas vivas con las de la hojarasca vio que algunas especies desaparecen con la muerte de las hojas y que se desarrollan los saprófitos primarios, algunos de los cuales ya están presentes en las hojas vivas.

-1976, COLLINS Estudió la colonización de las hojas de *Antirrhinum* sp. por *Sporobolomyces roseus* y *Cladosporium* cladosporioides y la interacción de los dos microorganismos.

Realizó la experiencia con hojas aisladas de dos edades, jóvenes y maduras. Las esterilizó superficialmente y lavó según el método de Williams et al., (1966), las hizo enraizar, las inoculó y mantuvo en condiciones ambientales controladas.

Evalúo las poblaciones de *S. roseus* usando: 1) Método de lavado de hojas y sembrando el agua de lavado; 2) Observación con contraste de fase del agua de lavado, midiendo las células presentes (para calcular el volumen total de levaduras) y finalmente 3) Método de caída de esporas (Last, 1955).

En *C. cladosporioides* analizó la germinación de esporas y midió el tubo de germinación en dos zonas: nervadura y lámina. Para ello decoloró según Janes, (1962) y tiñó con trypan blue.

También obtuvo sustancias lixiviadas a partir de las hojas de *Antirrhinum* sp. en los que determinó carbohidratos y

aminoácidos.

El autor considera que con las técnicas que utilizó es posible distinguir la influencia de la edad de la hoja, del efecto combinado de la edad y la estación, que se observa en los trabajos a campo.

Las hojas más jóvenes revelaron poseer poblaciones de microorganismos activos más pequeñas que las hojas más viejas. También demostró que variedades de la misma especie de planta en iguales condiciones ambientales no tienen necesariamente las mismas poblaciones de microorganismos en el filoplano.

La germinación de esporas y formación de tubos de germinación de *C. cladosporioides* mostró valores mayores en la nervadura media de las hojas más viejas. Es poco probable que sea exclusivo de este hongo y podría relacionarse con la mayor cantidad de exudados que se encuentran sobre las venas (Pesante, 1963). Este efecto combinado con la producción de esporas secundarias podría dar la distribución uniforme que se observa en el campo tanto para *Cladosporium* spp. como para otros hongos de las hojas.

El antagonismo entre las especies en estudio permite suponer que el tamaño de las poblaciones de microorganismos de las hojas está restringido por mutuo antagonismo entre los saprófitos del filoplano.

-1976, LINDSEY Y PUGH Estudiaron la sucesión fúngica en hojas de *Hippophae rhamnoides*, arbusto de hojas deciduas que coloniza dunas en la costa este de Inglaterra. El lugar del trabajo es una reserva natural en el peñón de Gibraltar que

se caracteriza por la presencia de un spray salino sobre todo el sistema duna-plantas y en el suelo hay iones de cloro y sodio (Rogers, 1961; Lindsey, 1973; Pugh y Lindsey, 1975)

Los autores analizaron la influencia de este ambiente sobre la sucesión fúngica. Para ello tomaron muestras desde el estadio de yema hasta la abscisión, durante tres años y aplicaron los siguientes métodos: 1) Observación microscópica de las hojas, aislamiento y cultivo de fructificaciones; 2) Clarificación (Shipton y Brown, 1962) para ver fructificaciones; 3) Observación con SEM; 4) Lavado de hojas y siembra de alicuotas del agua de lavado en PDA, MA (agar-malta) y CA (celulosa-agar); 5) Siembra de trozos de hojas en CA, incubación y observación de hongos de la superficie; 6) Incubación de hojas enteras en cámara húmeda y observación periódica (Keyworth, 1951); 7) Impronta de hojas sobre PDA (Potter, 1910); 8) Método de caída de esporas para cuantificar *Sporobolomyces* (Last, 1955; Pugh y Lindsey, 1975); 9) Esterilización superficial de hojas con nitrato de plata (Davies, 1935), lavado y siembra; 10) Estudio de yemas: a) lavadas y sembradas en CA y b) esterilizadas superficialmente y sembradas en el mismo medio.

A partir de los datos obtenidos los autores comprobaron la presencia de hongos en las hojas de *Hippophae* sp. desde el estado de yema hasta la caída de las hojas. Además observaron diferencias en las sucesiones del interior de las hojas respecto de la superficie foliar.

A. pullulans precede a *C. herbarum* y *E. purpurascens* y

crece en el surco de la nervadura media hasta formar clamidosporas en Agosto. Por el método de clarificación se comprobó que *A. pullulans* sigue creciendo en los tricomas hasta la caída de las hojas.

Sporobolomyces roseus resultó ser un habitante común en la superficie de las hojas de especies marinas, que soportan el efecto del agua de mar.

Los autores reconocen a *A. pullulans* como el primero en la colonización de la superficie, luego aparecen tres grupos. El primero de ellos está integrado por *C. herbarum*, *S. roseus* y *Phoma* spp.; el segundo por *E. purpurascens* y *A. alternata* y finalmente en las hojas amarillentas las especies más importantes son *Botrytis cinerea* y *Cephalosporium acremonium*.

La colonización del interior de la hoja se inicia con *A. pullulans*, siguen *C. herbarum* y *E. purpurascens*.

-1976, GREMMEN Hizo una lista de hongos parásitos y saprófitos presentes en *Pinus sylvestris* y *Pinus nigra* en Holanda. Como parásitos de hojas menciona a *Coleosporium tussilaginis*, *Lophodermium pinastri*, *Melampsora pinitorqua*, *Rhizina undulata* y *Scleroderris lagerbergii*.

Como saprófitos cita a: *Anthostomella formosa* en hojas muertas de *P. nigra*, *Ascocoryne sarcoides* en hojarasca de *P. sylvestris*, *Belonium biatorinum* en hojas senescentes de *P. nigra*, *Calothyrium pinastri* en hojas senescentes de *P. nigra*, *Cenangium acuum* en hojas muertas de *P. sylvestris*, *Dasyscyphus pulverulentus* en hojarasca de *P. sylvestris*, *Desmazierella acicola* en hojas senescentes de *P. nigra* y *P.*

sylvestris, *Diaporthe conorum* en hojas muertas de *P. sylvestris*, *Discocistella acuum* en hojas muertas de *P. nigra* y *P. sylvestris*, *Hyalotricha trichodea* en hojarasca de *P. sylvestris*, *Lentomita acuum* en hojas muertas de *P. sylvestris*, *Naemacyclus niveus* en hojas muertas de *P. sylvestris*, *Phacidium lacerum* en hojas senescentes de *P. sylvestris*, *Pseudohelotium pineti* en hojas muertas y decoloradas de *P. sylvestris*, *Pyrenopeziza pinicola* en hojarasca del año anterior de *P. sylvestris*, *Scoleconectria cucurbitula* en ramas y hojas de *P. sylvestris*, *Sphaeropsis ellisii* en hojas muertas de *P. sylvestris*, *Sydowia polyspora* en ramas muertas y hojas de *P. sylvestris* y *P. nigra* y por último *Valsa pini* en hojarasca de *P. sylvestris*.

-1976, COLLINS Y HAYES Estudiaron la variación estacional de la microflora saprofítica de las yemas y hojas de *Picea sitchensis* en la primera estación de crecimiento. Las muestras se tomaron de un bosque en Dumfriesshire, Inglaterra.

El método consistió en macerar hojas junto con solución de Tween 80 0,01%, sembrando distintas diluciones de la misma en dos medios de cultivo, uno selectivo para hongos filamentosos y levaduras y el otro para bacterias.

Luego de incubar, hicieron el conteo de las colonias que crecieron y por otro lado aislaron al azar 5 hongos filamentosos, 5 levaduras y 5 bacterias de cada caja de Petri y los identificaron.

Los autores obtuvieron un máximo en el número de

microorganismos poco después de la apertura de las yemas y el resto del año se mantuvo constante, salvo en junio que decreció el número de bacterias.

En las yemas obtuvieron valores altos de frecuencia en las escamas externas, mientras que en la parte interna el número resultó menor.

Con respecto al análisis cualitativo de la microflora *C. herbarum* y *Cephalosporium* sp. fueron los hongos filamentosos más frecuentes. Las levaduras estuvieron representadas por *Torulopsis* sp. en la primera parte del año y a partir de julio predominó *S. roseus*. Las bacterias pertenecieron al género *Bacillus*, *Brevibacterium* y una bacteria amarilla en forma de bastón.

-1976, DICKINSON Presentó una revisión bibliográfica de los trabajos relacionados con las especies fúngicas existentes sobre la superficie aérea de las plantas superiores, refiriéndose a los factores determinantes, enumerando los taxa presentes en diferentes superficies tales como yemas, hojas, tallos, flores y frutos, mencionando además las adaptaciones al ambiente epifito. Con respecto a los hongos epífilos propuso la clasificación que se incluyó en la página 12.

-1977, BERNSTEIN Y CARROLL Estudiaron la microflora de la superficie foliar de *Pseudotsuga menziesii*. El objetivo de este trabajo fue: identificar las categorías de microorganismos presentes; describir patrones de distribución microbiana en función de la ubicación en la acícula, la edad

de la misma y estimar la cobertura microbiana.

En el mes de setiembre tomaron muestras de hojas de diferentes edades y de distintas alturas de dos árboles, uno de 450 y otro de 100 años.

Las técnicas empleadas fueron: 1) Fluorescencia; 2) MEB, (Bernstein, Howard y Carroll 1973; 3) Cobertura microbiana y frecuencia de colonias. Midieron largo y ancho de las acículas, dividiéndolas por transectas perpendiculares al eje longitudinal de la hoja. Con una cuadrícula en el ocular del microscopio estimaron la cobertura microbiana.

Debido a las limitaciones del método no pudieron identificarlos hasta especie, por ello los agruparon en tipos celulares.

Mencionan a *Protococcus viridis* (alga verde) que en la cara superior de la hoja se la observó en la depresión de la nervadura media y en la cara abaxial asociada con los estomas. Establecieron que la cobertura aumenta en la cara inferior y permanece constante en la superior en hojas de 1-2 años.

Una segunda categoría importante de microorganismos fueron las Hifas Fúngicas Oscuras: se las observó paralelas al eje longitudinal de la hoja, con puentes cortos entre ellas, abundantes en la cara adaxial de las hojas de un año. Hacia el quinto año aparecieron en ambas caras, en las viejas declinó su proporción.

Tercera categoría, Colonias Oscuras o Puntos Negros: incluyen áreas de infección por parásitos de hojas, esporas,

aglomeración de células oscuras, *Atichia* sp., células levaduriformes en matriz gelatinosa. Las dos caras de la hoja tienen distintos patrones de distribución de microorganismos siendo más abundantes en la adaxial.

Cuarta categoría, Hifas Hialinas: incluyen Actinomycetes y otros hongos filamentosos, crecen paralelos a las hileras de estomas y también dentro de ellos, en la cara abaxial.

Quinta categoría, Colonias Hialinas: incluye organismos levaduriformes agrupados o células individuales, abundantes en las hojas de un año, decreciendo con la edad.

Con MEB comprobaron que la distribución de los microorganismos parecería estar relacionada con la topografía de la superficie de la hoja, ya que las células microbianas se observaron en la depresión de la nervadura y en las cavidades estomáticas y entre células epidérmicas. Las depresiones protegerían de los elementos físicos tales como luz solar y desecación y biológicos como insectos. Además podrían ser reservorios de humedad y de nutrientes lixiviados por la lluvia.

La cobertura microbiana fue mayor en la cara abaxial, aumentó con la edad y de manera más notoria en la cara inferior.

-1977, CARROLL, MÜLLER Y SUTTON Estudiaron los endofitos de las acículas de coníferas europeas. Las especies arbóreas analizadas fueron: *Abies alba*, *Picea excelsa*, *Pinus sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii*, *Taxus baccata*, *Pinus nigra*, *Sequoia sempervirens*. Las muestras fueron tomadas en

Zürich y Ochsenalp, Suiza y Fontainebleau, Francia.

Utilizaron esterilización superficial de las hojas y peciolo de diferentes edades y a diferentes alturas sobre el árbol, sembraron en medio agarizado y aislaron colonias.

Las frecuencias fúngicas fueron menores en las hojas jóvenes y aumentaron con la edad. Los hongos asociados al peciolo no aparecieron en la lámina y viceversa.

De hojas de *Picea excelsa* aislaron *Plectrophomella* sp; de *Pinus nigra*, *Naemacyclus niveus*; de *Pinus sylvestris*, *Leptostroma pinastri* [=anamorfo *Lophodermium pinastri*]; de *Pseudotsuga menziesii*, anamorfo de *Xylaria*; de *Sequoia sempervirens*, *Hemidothis* sp. *Plectrophomella* sp., *Cryptosporiopsis* sp. y *Trimmatostroma salicis*; de *Taxus baccata*, *Phyllosticta concentrica* [=anamorfo *Guignardia philoprina*]. Este último es sistémico.

También aislaron hongos típicos de la epiflora como *A. pullulans*, *S. pythiophila*.

Con respecto al origen de los endofitos los autores consideran que la infección podría ser por crecimiento miceliano desde la semilla, por injertos o por esporas. En el caso de las hojas se da la última situación.

-1977, McBRIDE y HAYES El objetivo de los autores fue estudiar el filoplano de *Larix decidua*. Lo hicieron sobre plántulas obtenidas de semilla y la metodología que aplicaron fue: 1) Observación directa de hojas clarificadas y teñidas con azul de Trypan; 2) Siembra en medios agarizados de distintas diluciones de un macerado de hojas con solución de

extracto de levadura.

Tomaron muestras de las hojas cotiledonares, de la plúmula y de la hojarasca. Aislaron bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Determinaron bacterias Gram+ o Gram-, identificaron hasta género o las caracterizaron morfológicamente. Las levaduras se identificaron por el método de Lodder y VanRij (1952) y también testearon su actividad de lipasa. Con respecto a los hongos filamentosos hicieron conteo del número de colonias por caja y lo expresaron como número de colonias por gramo de peso fresco de hojas.

El crecimiento miceliano fue mayor en la cara inferior que en la superior, mayor en la parte inferior de la plántula respecto del ápice; aumentando con el tiempo en cualquier parte de la planta.

Las levaduras aisladas fueron *Rhodotorula glutinis*, *S. roseus*, *Cryptococcus* sp. y *Torulopsis* sp. Los hongos con mayor frecuencia fueron *C. herbarum*, *Stemphylium botryosum*, *F. oxysporum*, *Acremonium* spp., *E. purpurascens*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus clavatus* y *B. cinerea*.

Finalmente puntualizaron que las hojas jóvenes tienen una alta densidad de esporas pero no se observó un crecimiento hifal extenso. Las levaduras no crecieron en los aislamientos de hojas muy jóvenes, pero a partir de un mes de vida de las mismas empezaron a aumentar en forma logarítmica e independientemente de las condiciones climáticas.

El patrón de desarrollo de hongos filamentosos, levaduras

y bacterias indicó que la edad de las hojas es el factor más importante en el desarrollo del filoplano de *Larix decidua*.

-1977, LEHMAN Y HUDSON Se fijaron como objetivo analizar el efecto que tiene el agregado de nutrientes en la sucesión fúngica de la hojarasca de *Pinus sylvestris*. El lugar del estudio fue Brandon Park, Suffolk, Inglaterra.

La metodología consistió en coleccionar hojas recién caídas, identificarlas y colocarlas en el suelo, con o sin tratamiento con solución de fertilizante. Las retiraron periódicamente y determinaron la flora fúngica por los siguientes métodos: 1) Esterilización superficial, lavado y siembra; 2) Incubación en cámara húmeda; 3) Disección y observación de la capa epidérmica.

De las hojas no tratadas se aislaron tres parásitos: *Lophodermium pinastri*, *Naemacyclus niveus* y *Sclerophoma pithyophila*. Los dos primeros son endofitos y el último es un colonizador de la superficie. Por otra parte *S. roseus* decreció luego de la caída de las hojas mientras que *Bullera* sp. aumentó.

En las hojas tratadas se vio que de las diversas soluciones de fertilizantes utilizadas, sólo la urea influyó en la flora fúngica modificando el patrón de sucesión típico. La urea aumenta el pH de la hojarasca y *C. herbarum* y *Polyscytalum fecundissimum* que eran raros en hojas no tratadas aumentaron su frecuencia notablemente, también lo hicieron *S. pithyophila*. Se aislaron además *Phoma* sp. y

Epicoccum purpurascens.

-1977, LATCH Y MCKENZIE Determinaron la flora fúngica de *Lolium perenne* y *L. multiflorum* en Gales. Sembraron estas pasturas en agosto, dejaron pastar al ganado, al que luego sacaron para hacer el muestreo mensualmente. Las muestras se agitaron en agua estéril, se prepararon diluciones de la suspensión que se sembraron en PDA acidificado y se incubaron.

La flora fúngica de las dos pasturas fue similar. Aislaron 30 cepas distintas de hongos.

Encontraron un patrón estacional en la flora fúngica con mayor número de colonias en verano y otoño y menores en invierno.

Phoma fue el género más común y con mayor número de especies (*P. exigua*, *P. macrostoma*, *P. patouillardii*) y se lo aisló más frecuentemente en verano y otoño.

Acremonium fue el que lo siguió en importancia (*A. kiliense*, *A. curvulum*, *Acremonium* sp.) pero predominó en primavera y comienzos del verano.

El género *Cladosporium* estuvo representado por *C. cladosporioides* y *C. herbarum*, esporulando abundantemente en verano. Finalmente a *Tricellula aquatica* se lo aisló principalmente en mayo, junio y julio.

-1977, WHITTLE Estudió la micoflora de conos y semillas de *Pinus sylvestris* con el objeto de detectar posibles patógenos. El trabajo se llevó a cabo con semillas jóvenes provenientes de un "stand" en Hampshire (Alice Holt Forest) y

conos y semillas maduras de Thetford, Norfolk y Culbin, Morayshire.

Los primeros muestreos se realizaron en el momento de la polinación y luego durante 18 meses.

Algunos de los métodos aplicados fueron: 1) Cultivo de óvulos, escamas, semillas con y sin esterilización en PDA; 2) Lavado de semillas y cultivo de diferentes diluciones del agua de lavado en PDA; 3) Determinación del porcentaje de humedad y viabilidad de las semillas; 4) Determinación de la contaminación posible del polen con hongos; 5) Determinación del contenido de esporas del aire; 6) Esterilización superficial de ramas y siembra en PDA u observación microscópica; 7) Evaluación del efecto de temperaturas altas (45°C y 60°C) sobre cultivos de hongos.

Los resultados obtenidos revelaron que *Sclerophoma pythiopila* es el principal constituyente de la micoflora de las semillas inmaduras y cambia durante el proceso de maduración y liberación de las mismas. Durante el almacenamiento hubo un aumento en la frecuencia de los hongos típicos de almacenaje, como lo son las especies de *Penicillium*. La flora de las semillas almacenadas provino de estadios tempranos de la misma y luego las poblaciones se modificaron de acuerdo a las condiciones en que se almacenaron.

-1977, GAMUNDI, ARAMBARRI Y GIAIOTTI Hicieron un relevamiento de la micoflora que coloniza la hojarasca de *Nothofagus dombeyi* ("coihue") en dos localidades, Península de Quetrihué

y Lago Gutierrez, Argentina. La metodología consistió en la observación de fructificaciones que aparecen en la hojarasca natural o en hojas esterilizadas y colocadas en el sitio de experimentación entre el mantillo e incubadas en cámara húmeda en el laboratorio.

-1978, WILDMAN Y PARKINSON Estudiaron la sucesión fúngica en el filoplano e interior de las hojas vivas de *Populus tremuloides*, en el valle de Kananaskis, Alberta, Canadá, durante una estación de crecimiento.

Tomaron muestras de distintos estadios de la hoja, a diferentes alturas sobre el árbol y en tres subáreas.

La metodología fue: 1) Lavado superficial de hojas; 2) Esterilización superficial con nitrato de plata; 3) Incubación en cámara húmeda; 4) Impronta de la superficie foliar en esmalte de uñas teñido con azul de algodón al lactofenol, observación y medición de esporas y micelio; 5) Micoflora del aire (Gregory, 1973; Lamb y Brown, 1970).

Los autores obtuvieron colonización superficial en las catáfilas que cubren las yemas. Las hojas jóvenes resultaron poco colonizadas. Los propágulos fúngicos se adhirieron más frecuentemente a la cara adaxial en las hojas maduras, en consecuencia el desarrollo hifal fue mayor en esa cara.

Los saprófitos primarios *C. herbarum*, *A. alternata*, *E. purpurascens*, *A. pullulans* y *Botrytis cinerea* resultaron activos vegetativamente en el filoplano antes de la senescencia.

El micelio aumentó hacia la senescencia principalmente en

la cara abaxial, en la adaxial pareciera haber algún factor que limita su crecimiento (los autores postulan la disponibilidad de fuente carbonada).

El número de esporas en la senescencia resultó mayor en la cara adaxial.

La colonización interna aumentó hacia la senescencia, lo que indicó una lenta penetración de los tejidos de la hoja.

Al caer las hojas se observó disminución en la cantidad de micelio posiblemente por autólisis o por acción de insectos que se alimentan de micelio.

La micoflora del aire y del filoplano de *Populus tremuloides* resultaron semejantes en cuanto a su composición florística.

Se observaron diferencias en la distribución de la flora fúngica y la longitud de micelio con la altura del árbol, principalmente en la cara adaxial. Las hojas senescentes no mostraron diferencias en la longitud de micelio en relación a la altura sobre el árbol.

-1978, CARROLL Y CARROLL Determinaron la presencia de endofitos en las acículas de 19 coníferas del oeste de Oregon y sur de Washington.

La metodología consistió en seleccionar hojas de diferentes edades, esterilizarlos superficialmente, sembrar fragmentos en agar extracto de malta y aislar endofitos durante 6 meses.

Las coníferas estudiadas fueron *Abies amabilis*, *A. concolor*, *A. grandis*, *A. lasiocarpa*, *A. magnifica*, *A.*

procera, *Picea breweriana*, *P. engelmannii*, *P. sitchensis*, *Pinus attenuata*, *P. contorta*, *P. lambertiana*, *P. monticola*, *P. ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii*, *Sequoia sempervirens*, *Taxus brevifolia*, *Tsuga heterophylla* y *T. mertensiana*.

El grado de infección varió con las localidades dando valores más altos en regiones más húmedas.

También se vieron diferencias de susceptibilidad a la infección según los hospedantes, teniendo en algunas coníferas preferencia por la infección de la lámina de la hoja.

Las especies arbóreas que crecen sólo a gran altura sobre el nivel del mar tuvieron baja infección en la lámina de la hoja.

Todas las especies de *Picea* y *Tsuga* presentaron infección en el pecíolo.

Los autores presentaron una tabla en la que incluyeron las especies de coníferas, las frecuencias de las especies fúngicas que se dan en cada una de ellas, discriminando pecíolo y lámina.

Encontraron un número reducido de especies dominantes, siendo el resto de las especies poco frecuentes o raras.

De *Pinus attenuata* aislaron *Naemacyclus* sp. y *Leptostroma* sp.; de *P. contorta* aislaron *Leptostroma* sp., *Cladosporium* sp. y *Naemacyclus* sp.; de *P. lambertiana* aislaron *Leptostroma* sp. y *Naemacyclus minor*; de *P. monticola* aislaron sólo *Leptostroma* sp. y de *P. ponderosa* aislaron *Dothichiza pityophila*, *Leptostroma* sp., *Gloeocoryneum cinereum* y

Naemacyclus sp.

Encontraron cierta especificidad por el hospedante y por la ubicación en la hoja. Los autores postularon que esta especificidad de los endofitos puede utilizarse como una medida de la afinidad taxonómica entre las coníferas estudiadas.

Algunas especies arbóreas presentaron una baja incidencia de endofitos incluso en zonas bajas y húmedas, tal es el caso de *Tsuga heterophylla*, *Abies amabilis* y *Pinus contorta*. En estos casos evidentemente la especificidad del hospedante es un factor importante para determinar la distribución de los endofitos.

-1978, BOPAI AH, SUHAS, WANI Y RAI Determinaron cuali y cuantitativamente la microflora de la filosfera de diferentes malezas, plantas cultivadas y forestales en Bangalore, India.

La metodología fue: 1) Lavado según Dickinson (1967) y siembra del agua de lavado; 2) Método de maceración según Menna (1959a).

Las poblaciones de bacterias Gram- y pigmentadas predominaron en todas las superficies de las hojas.

Las cepas aisladas correspondieron a los siguientes géneros: *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Streptobacillus*, *Xanthomonas*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Cándida*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Haplosporangium*, *Isariopsis*, *Nigrospora*, *Pestalotia*, *Pseudoplea*, *Phoma* y *Sporobolomyces*.

-1979, SHARMA Y GARG Se fijaron como objetivo comprobar si la presencia del patógeno *Erysiphe graminis hordei*, causante del mildiu pulverulento de la hoja de la cebada altera la micoflora habitual. Para ello tomaron hojas sanas e infectadas de la misma edad.

La metodología fue: 1) Observación de improntas de hojas tomadas en una película adhesiva, teñidas con azul de algodón y montadas en lactofenol, en las que cuantificaron las esporas observadas; 2) Cultivo de Suspensión de esporas: para ello incubaron discos de hojas, lavaron con agua estéril y sembraron la suspensión obtenida pura y en diferentes diluciones en PDA con antibióticos; 3) Método de lavado de discos de hojas y siembra en PDA.

A. alternata y *E. purpurascens*, colonizadores tempranos de la mayoría de las plantas, fueron los más comunes en hojas no infectadas, mientras que *Botrytis cinerea* se lo aisló sólo de hojas no infectadas.

En las hojas infectadas las especies más comunes fueron *Candida albicans*, colonias levaduriformes, *Cladosporium* spp., *A. pullulans* y *Memnoniella echinata*.

La infección de las hojas con "mildew" pulverulento determinó los siguientes cambios en la población fúngica de la superficie de las hojas: 1) El grupo de hongos restringido a hojas no infectadas es reemplazado por otro grupo más o menos similar en hojas infectadas; 2) Algunos de los micromicetes del filopiano aumentaron cuantitativamente. Estas diferencias podrían deberse a cambios en la composición

química y la naturaleza de los nutrientes de la superficie. Otro posible factor sería la senescencia temprana de las hojas infectadas.

El grupo integrado por *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *Curvularia* sp. no se vio afectado por la infección.

La superficie de hojas infectadas y no infectadas podrían constituir dos nichos ecológicos distintos debido a sus niveles nutricionales.

-1979, BAKER, DUNN Y SAKAI Analizaron las comunidades fúngicas del filoplano de plantas vasculares endémicas en Hawaii: *Metrosideros collina* var. *polymorpha*, *Acacia koa* var. *hawaiiensis* y *Cheirodendron trigynum* var. *trigynum*. Se propusieron comprobar si las plantas endémicas tenían en su filoplano hongos endémicos. Las muestras se tomaron desde los 690 a 2510 metros de altura. *Metrosideros* sp. crece en todo el gradiente, *Acacia* sp. se limita a alturas entre 1200 y 2430m y *Cheirodendron* sp. crece mejor a 1280m.

Se tomaron muestras de hojas de distintas edades y a intervalos de 300 metros, simultaneamente en cada lugar se expusieron 5 cajas con medio agarizado para determinar el contenido de esporas del aire.

Aplicaron los siguientes métodos: 1) Incubación en cámara húmeda de hojas lavadas; 2) Lavado de hojas y siembra de distintas diluciones; 3) Maceración de hojas previamente lavadas y siembra de diluciones de la suspensión en cajas de Petri que se sometieron a fotoperíodo (12hs luz y 12hs oscuridad); 4) Estructura y composición de la hoja

(determinación de sustancias pécticas, cutina, suberina, grasas y lignina según Jensen (1962), realización de cortes con microtomo para ver caracteres morfológicos); 5) Observaciones con MEB.

Los resultados obtenidos con MEB demostraron que la cutícula es el lugar apto para el desarrollo fúngico y bacteriano.

La superficie abaxial de *Cheirodendron* sp. resultó cubierta por una red de hifas que rodeaban, cruzaban o entraban a los estomas; también había un desarrollo hifal intenso y esporulación en la cara adaxial.

En el caso de *Metrosideros* sp. que es pubescente, en la cara abaxial se observaron fumaginas, como así también hifas fúngicas en las pubescencias.

Las comunidades fúngicas de *Metrosideros* sp. y *Acacia* sp. estaban formadas por todos los colonizadores activos citados en la bibliografía, menos *Botrytis* sp. que no se aisló de *Acacia* sp. Esto confirmó la hipótesis de que los hongos del filoplano son especies cosmopolitas.

El mayor número de especies fúngicas de *Metrosideros* sp. se dio a una altura entre 1600 y 1650m que coincidió con el nivel de niebla y nubes respectivamente. A menor altura, 690-1370m el número de especies fúngicas de *Metrosideros* sp. decreció. Los autores observaron que la técnica de lavado de hojas en *Metrosideros* sp. no dio grandes cambios respecto a siembra del agua de lavado, lo que podría deberse a que la pubescencia de las hojas impide un lavado eficiente. En

cambio en el caso de los filodios de *Acacia* sp. que tienen una superficie lisa se vio bien la diferencia entre hongos transitorios y residentes determinados con los dos métodos de aislamiento.

Mencionaron como endémicos en *Metrosideros* sp. a una *Capnodiaceae* (Morphological Form I), *Mycosphaerella metrosideri* y *Leptosphaeria* sp. y en el género *Acacia* a *Kordyana* sp.

-1979, GAMUNDI, ARAMBARRI Y BUCSINSZKY Hicieron un relevamiento de la micoflora que coloniza la hojarasca de *Nothofagus dombeyi* en Península de Quettrihué y Lago Gutiérrez, Argentina.

Aislaron las siguientes especies: *Capsicumyces delicatus*, *Trichoderma polysporum*, *T. koningii*, *Oidiodendron tenuissimum*, *Trichocladium opacum*, *T. diversi-coloratum*, *Helicon multiseptatum*, *Cordana andinopatagonica*, *Scolecobasidium dendroides*, *Janetia bacilliformis*, *Acrophragmis laevispora*, *Xylohypha nigrescens*, *Volutella ciliata*, *Bactrodesmium traversianum*, *Harknessia antarctica*, *Papulaspora sepedonioides*, *Zoellneria eucalypti*, *Hymenoscyphus titubans*, *H. nubilipus* y *Marasmius hemimycena*.

-1979, CARROLL Estudió los patrones de distribución y estimó el volumen celular de los microepífitos de las acículas de *Pseudotsuga menziesii* a tres niveles de altura sobre el árbol.

La estimación del volumen celular de los microorganismos se realizó a partir de cortes a mano alzada de las hojas que

fueron fotografiadas y ampliadas.

El perímetro de la hoja se dividió en zonas a fin de trazar los patrones de distribución. El perfil de los microorganismos se trazó sobre "Mylar film", se cortó y luego se pesó en una microbalanza los trozos correspondientes a cada zona de la hoja.

Se observó que las células microbianas estaban concentradas en la depresión de la nervadura media y sobre los estomas.

El volumen celular de los microorganismos en la cara superior de las acículas aumentó en el primer año y declinó en los subsiguientes. En la cara inferior aumentó desde el primer año al tercero y decreció hacia el cuarto.

El volumen de microorganismos en relación a la superficie foliar fue mayor en niveles más bajos del árbol y decreció con la altura.

También hizo una estimación total del volumen celular de microorganismos para todo el árbol que fue igual a 1093cm³.

-1980, ANDREWS, KENERLEY Y NORDHEIM Se propusieron analizar el efecto de las diferentes posiciones en la copa del árbol sobre las poblaciones de microorganismos. El hospedante elegido fue *Malus pumila* var. McIntosh (manzana) y el lugar Arlington, Wisconsin.

Al muestrear consideraron la altura en el árbol, la orientación (N,S,E,O) y la proximidad a la periferia de la copa.

Aplicaron método de lavado y siembra de distintas

diluciones en diferentes medios de cultivo específicos para hongos filamentosos, levaduriformes, levaduras y bacterias.

En un trabajo preliminar los autores comprobaron que los factores que mayor efecto tienen sobre las poblaciones son primero la altura, segundo la proximidad a la periferia y por último la orientación.

Aplicaron análisis de la varianza para cada categoría de microorganismos y cada variable excluyendo el efecto del árbol.

Se observó que tanto para hongos filamentosos como levaduras la altura y la posición lateral fueron los factores más significativos ($p=0,05$). Teniendo los dos factores igual importancia. La tendencia fue menos clara para las bacterias. -1980, ANDREWS Y KENERLEY Investigaron la población de microorganismos de la yema y de las hojas jóvenes de la manzana, variedad Red Melba y Cortland en Wisconsin.

Tomaron muestras de toda la periferia de los árboles y de alturas entre 1m y 5m.

Aplicaron el método de lavado y siembra del agua de lavado e hicieron observaciones con MEB.

La densidad de las poblaciones, para todas las categorías de microorganismos, fue $1.(10)^4$ propágulos por gramo de peso fresco de tejidos de yema en dormición en el mes de abril.

El número de microorganismos fue mayor en el momento que las yemas comenzaron a inflarse y decreció al emerger las hojas, excepto para las levaduras, que se retrasaron levemente.

También aislaron especies de *Pseudomonas* fluorescentes cuyos valores fueron oscilantes.

Todos los microorganismos fueron abundantes en la superficie externa de las escamas de las yemas. Hacia el interior encontraron poblaciones con valores altos de microorganismos sobre los pelos. Las escamas internas estuvieron menos colonizadas que las externas.

Los primordios foliares y florales tuvieron número bajo de microorganismos, lo mismo que las hojas expandidas.

Los hongos aislados pertenecieron a los géneros *Coniothyrium*, *Alternaria*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stachybotrys* y *Sclerotium*. Las levaduras encontradas pertenecieron a los géneros *Sporobolomyces* y *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Aureobasidium pullulans*.

La flora bacteriana estuvo representada por *Pseudomonas* fluorescentes, especie Gram- y que se caracterizó fisiológicamente.

-1981, MINTER Determinó los micromicetes presentes en hojas, ramas y conos en descomposición de pinos en Checoslovaquia. Diferenció entre la hojarasca natural y el material que llega al suelo por tala o viento. Definió como micromicetes a aquellos hongos que fuctifican en hojas, conos o ramas individuales.

Las muestras fueron tomadas durante 2 meses en el otoño de 1979, principalmente de *P. sylvestris* y en menor número de pinos autóctonos.

En el material observado se determinaron 145 especies, de las cuales 37 resultaron nuevas para Checoslovaquia.

El autor incluyó la lista de especies observadas, el hospedante, tipo de hojarasca, lugar de colección, colector y herbario.

Se destacó la diferencia en la variedad de especies entre la hojarasca natural y las ramas caídas. En estas últimas se observaron más especies, mientras que la hojarasca natural parece tener una micoflora más restringida. Esta diferencia probablemente se deba a diferencias en el contenido de nutrientes.

-1981, BUNSTER REYES Analizó la sucesión fúngica asociada a la descomposición de las acículas de *Pinus radiata* en dos localidades, Placilla y Laguna Verde, de Valparaíso, Chile.

Hizo muestreo estacional durante un año de hojas verdes (distintas edades), hojarasca L, F1 y F2.

Aplicó los siguientes métodos: 1) Método de lavado según Harley y Waid (1955); 2) Esterilización superficial con cloruro de mercurio al 1%; 3) Cámara húmeda.

Se obtuvieron 46 géneros y 57 especies.

En las hojas verdes se cita a *Naemacyclus niveus* como único colonizador interno en ambas localidades mientras que en el filoplano hay diferencias según la localidad. En Placilla los principales colonizadores superficiales fueron *A. pullulans* y *Cheiromyces microscopica*; en Laguna Verde *Cryptococcus laurentii*, *Cheiromyces microscopica*, *Cladosporium herbarum* y *Pestalotia neglecta*.

En la hojarasca L, se agregó *Ceuthospora pinastri*, tanto colonizador interno como del filoplano en Placilla. Algunos organismos del filoplano de hojas verdes aquí colonizan el interior; tal fue el caso de *Cheiromycella microscopica* y *Pestalotia neglecta*. Además *N. niveus* fructificó en el horizonte L.

Con respecto a *C. herbarum* se lo aisló sólo en Laguna Verde y del filoplano. *Botrytis cinerea*, *A. alternata*, *E. purpurascens* se aislaron en ambas localidades pero con frecuencias bajas.

-1981, MISHRA Y DAS Estudiaron la sucesión fúngica en hojas de *Pinus kesiya* desde la yema hasta la hojarasca.

La experiencia se realizó en un "stand" de 10 años de edad, durante dos años.

Se aplicaron métodos de lavado, esterilización y observación microscópica de hojas incubadas en cámara húmeda.

En el filoplano encontraron *Penicillium chrysogenum*, micelio estéril blanco, *S. roseus*, *C. herbarum* y *A. pullulans* en todos los estadios. Mientras que *Mucor hiemalis*, *T. viride* y *Fusarium sporotrichoides* se restringieron a hojas maduras y hojarasca

Con respecto a los endofitos, en todos los estadios se aisló un micelio estéril blanco. En las yemas se encontró además *S. roseus* y *Pleochaeta setosa*; en las hojas maduras dominó *Stemphylium* sp. y en hojas senescentes y hojarasca dominaron *Penicillium chrysogenum* y *Phoma humicola*. En este último sustrato aparecieron apotecios de dos especies de

Lophodermium.

En general hubo un incremento de microorganismos desde la yema hasta la hojarasca. Los autores sugirieron que se debe a la paulatina remoción de las ceras presentes en las hojas por acción de los mismos organismos. En las hojas jóvenes se encontró mayor proporción de ceras que contendrían compuestos antifúngicos (Blakeman y Szejnberg 1973). Estas sustancias constituyen una barrera que reduce la lixiviación de nutrientes necesarios para los microorganismos.

-1981, BREEZE Y DIX Estudiaron la comunidad fúngica de las hojas de *Acer platanoides* desde la hoja joven hasta la senescencia. La experiencia se realizó en la Universidad de Sterling, Escocia.

Los métodos aplicados fueron: 1) Impronta de ambas caras de las hojas en pasta de celulosa según el método de Dickinson, Watson y Wallace, (1974); 2) Cálculo de biomasa tanto para hongos filamentosos como levaduriformes a través de mediciones de largo hifal y radio celular; 3) Mediciones de precipitación, temperatura y humedad mientras duró la experiencia.

Los hongos que encontraron fueron los que comunmente se aislaron del filopiano de Angiospermas en zonas de clima templado como levaduras, especies de *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Stemphylium*, *Alternaria* y *Aureobasidium pullulans*.

De los datos obtenidos los autores concluyeron que la comunidad fúngica en la superficie de la hoja es bastante inestable y que las poblaciones que crecen activamente se

pierden y son reemplazadas por otras, repetidas veces, hasta que en otoño se establece una comunidad más estable. Este fenómeno se debe posiblemente a los factores ambientales que son los que controlan esporulación, deposición, crecimiento, pérdida de esporas y micelio.

Las comunidades fúngicas se desarrollaron con un patrón similar en ambas superficies de la hoja, aunque el número de propágulos resultó mayor en la cara adaxial, mientras que la germinación y el crecimiento hifal fueron mayores en la cara abaxial. En esta última las condiciones son más favorables debido a que existe menos competencia, protección de la luz directa del sol, menor lavado de nutrientes por la lluvia y mayor número de estomas que determinarían mayor humedad.

Los autores destacaron la importancia de las formas levaduriformes que dominaron con su biomasa en la comunidad. *Stemphylium* sp. y *Epicoccum* sp. hicieron un aporte importante a la biomasa miceliana.

-1981, PENNYCOOK Y NEWHOOK Estudiaron las poblaciones de hongos, levaduras y bacterias del filopiano de *Malus sylvestris* en Auckland, Nueva Zelanda. Tomaron muestras de yemas florales, hojas en roseta, hojas en expansión y hojas expandidas de árboles no pulverizados y hasta la caída de las hojas durante dos estaciones de crecimiento.

Utilizaron hojas sin irradiar o irradiadas con UV, en ambas caras o en una de ellas y aplicaron los siguientes métodos: 1) Maceración, dilución y siembra; 2) Método de caída de esporas (para hongos productores de balistosporas).

Utilizaron dos medios de cultivo Agar-rosa de bengala (Martin, 1950) y agar-glucosa-caseína (Jensen, 1930). Hicieron conteo de colonias y subcultivos para la identificación.

Los autores observaron que la yema floral cerrada tenía una densa microflora que disminuía con la apertura. Algunas especies desaparecían y se establecían otras. Las hojas sin desplegar tenían una microflora que incluía especies derivadas del aire. La densidad de la población disminuía mientras la hoja estaba en expansión y luego aumentaba cuando la hoja alcanzaba su tamaño completo. No se observaron diferencias respecto a la densidad de las poblaciones de hongos en las dos caras de la hoja, aunque ambas aumentaron levemente en verano.

Tilletiopsis minor aumentó en marzo en la cara abaxial y se mantuvo con alta densidad de población hasta la caída de las hojas en junio.

Las poblaciones de levaduras y bacterias fueron más densas en la cara abaxial. Las levaduras aumentaron en primavera y verano y decrecieron en otoño mientras que las bacterias aumentaron en primavera y verano, decrecieron al fin del verano y volvieron a aumentar a fines de otoño.

-1981, MILLAR Hizo una revisión bibliográfica del orden Coniferales en especial del género *Pinus* en relación al proceso de infección en las hojas analizando temas tales como características del sustrato, deposición de propágulos, microflora del filoplano, interacciones en el filoplano,

proceso de infección, formación de apresorios en la superficie de las acículas, en la cámara estomática, formación de vesículas superficiales y subestomáticas, penetración directa a través de la cutícula, infección latente, factores que influyen en la infección (ceras epicuticulares, exudados, capacidad buffer de las hojas, endofitos no patógenos, heridas, insectos).

-1981, MISHRA Y DICKINSON Estudiaron durante un año los hongos que habitan hojas verdes y recién caídas de *Ilex aquifolium*, en Close House, localidad ubicada al oeste de Newcastle-upon-Tyne, Inglaterra durante un año.

El arbusto estudiado tiene hojas perennes que permanecen fisiológicamente activas 5-8 años.

Analizaron el patrón de desarrollo microbiano estacional y la influencia de la edad de las hojas. Para ello aplicaron los siguientes métodos: 1) Impronta de ambas caras de las hojas en nitrato de celulosa según Dickinson, Watson y Wallace (1974) para cuantificar el número de levaduras y la longitud hifal; 2) Observación con MEB; 3) Método de lavado y siembra de distintas diluciones en PDA y AA; 4) Lavado de hojas y siembra en AA; 5) Incubación de hojas en cámara húmeda.

Por el método de la impronta vieron que las levaduras eran comunes en hojas de 2-3 años y predominaban en otoño y comienzos de invierno. En ambas caras de las hojas encontraron poblaciones equivalentes. El largo hifal siguió el mismo patrón con mayor crecimiento en la cara abaxial. En

otoño encontraron mayor número de esporas fúngicas en las hojas verdes.

El MEB les aportó información sobre el área ocupada por los microorganismos, su distribución en relación a la topografía de la hoja y sobre la ubicación de los conidióforos fúngicos. En las hojas verdes rara vez observaron conidióforos, excepto al fin del otoño. En cambio fueron abundantes en la hojarasca, principalmente los conidióforos de *Acremonium* sp.

Por los métodos de cultivo obtuvieron más propágulos viables en la hojarasca que en hojas vivas. El principal habitante de las hojas verdes fue *Cladosporium* cladosporioides durante todo el año; *Acremonium strictum* y *Phoma* sp. en verano y otoño. En la hojarasca a éstos se agregó *Alternaria alternata*.

El hongo más restringido respecto a las estaciones fue *Aureobasidium pullulans*, predominó en junio y declinó en septiembre. En general los hongos filamentosos fueron abundantes en junio, setiembre y noviembre y declinaron hasta abril.

Al comparar improntas de hojas verdes vieron que las hojas maduras y viejas tenían más poblaciones de levaduras con respecto a las jóvenes y la cara abaxial estaba más colonizada que la adaxial para todas las edades aunque la diferencia fue notable en las hojas jóvenes.

Al comparar largo hifal con la edad de las hojas sólo se encontraron hifas cortas antes de setiembre y en las hojas

jóvenes pocos micrones de crecimiento hifal.

Los datos obtenidos en hojas lavadas y sembradas de 3 estadios diferentes no revelaron un patrón de colonización diferente. Las del ápice fueron menos colonizadas que las del medio y la base del tallo. Ningún taxa pareció tener preferencia por algún estadio de la hoja.

Acremonium sp., *Cladosporium* sp. y *Phoma* sp. fueron importantes colonizadores de la hojarasca y se establecieron en la hoja verde antes de la caída. *Phoma* sp. fue común en hojas más viejas.

-1981, ARAMBARRI, GAMUNDI Y BUCSINSZKY Continuaron con el relevamiento de la micoflora que coloniza la hojarasca de *N. dombeyi* (coihue) en dos localidades Península de Quettrihué y Lago Gutiérrez, Argentina.

Se aislaron los siguientes hongos: *Verticillium psalliotae*, *Pleurocatena foliicola*, *Chalara brevicaulis*, *Ch. microspora*, *Ch. aurea*, *Ch. dualis*, *Trichocladium asperum*, *Torula herbarum*, *Sporidesmium rubi*, *Chloridium lignicola*, *Phaeostalagmus tenuissimus*, *Cylindrocolla macrospora*, *Pulvinotrichum album* y *Sistotrema brinkmannii*.

-1981, ARAMBARRI Inició el estudio de la micoflora de la hojarasca de *Nothofagus obliqua* (roble pellín) y *N. pumilio* (lenga), dos especies caducifolias y con hojas más susceptibles al ataque de hongos que *N. dombeyi*. La metodología fue similar a la empleada en los trabajos de *N. dombeyi*, ya citados y la localidad fue San Martín de los Andes, Neuquén, Argentina.

Se aislaron los siguientes hongos: *Septoria nothofagi*, *Myrothecium verrucaria*, *Trichothecium roseum*, *Gliomastix cerealis*, *Chalara novae-zelandae* y *Aphanocladium tomentosum*. Siendo el último una nueva especie.

-1982, MILLER Y ROY Se fijaron como objetivo caracterizar cuanti y cualitativa la micoflora de las hojas, vainas y semillas de *Glycine max* (soja).

Las experiencias se llevaron a cabo en el estado de Mississippi en la Universidad "Plant Science Farm", Starkville M.S.

Tomaron muestras de hojas, vainas y semillas en distintos estados de madurez. En las hojas y vainas cortaron discos a partir de distintos sectores. Las muestras fueron esterilizadas superficialmente y sembradas en PDA.

Se aislaron 56 taxa a partir de hojas, 49 a partir de vainas y 38 a partir de semillas.

La micoflora de las vainas y las semillas resultó similar.

Los hongos que se aislaron con mayor frecuencia fueron *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, *Alternaria alternata*, *Fusarium* spp., *Cercospora kikuchii*, *Phoma* spp. y especies de hongos que causan antracnosis.

Los hongos de mayor frecuencia y los patógenos de soja aumentaron sus frecuencias con la edad de los órganos de la planta. Tal es el caso de *A. alternata*, *Phoma* spp., *Colletotrichum dematium* var. *truncata* y *Glomerella cingulata* en hojas; *D. phaseolorum* var. *sojae* y *Fusarium* spp. en vainas y semillas y *C. kikuchii* en vainas. Sin embargo *D.*

phaseolorum var *sojae* y *A. alternata* decrecieron en hojas y semillas respectivamente. Los hongos con frecuencias menores y los reconocidos como saprófitos decrecieron o se mantuvieron constantes con el aumento en edad de los órganos.

También aislaron como endofitos además de los ya mencionados a *Chaetomium globosum*, *E. purpurascens*, *Fusarium semitectum*, *Nigrospora* sp., *Paecilomyces* sp., *Pestalotia* sp., *Pithomyces chartarum* y *Cladosporium herbarum*. *E. purpurascens* y *P. chartarum* están citados como saprófitos estrictos; de acuerdo a estos resultados serían residentes con fase parasítica.

-1982, CABRAL, estudió la filosfera de *Eucalyptus viminalis* en una plantación en la localidad de Ramallo, provincia de Buenos Aires, Argentina. Utilizó el método de lavado y el de esterilización superficial de las hojas previo al aislamiento de las cepas. Para la identificación de las mismas realizó cultivos en medios semi-sintéticos, inoculó sobre hojas, identificó sobre el sustrato natural e irradió cultivos con UV. También aplicó métodos de observación directa con MEB y observación de fructificaciones sobre el sustrato.

Entre las especies aisladas con mayor frecuencia del filoplano figuran *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *E. purpurascens*, *Phoma* sp., *Microsphaeropsis callista*; con frecuencias menores *Fusarium* sp., *Pseudodiplodia* sp. y *P. oxanthi*.

Se citan como endofitos de mayor frecuencia a *Coccomyces*

martinae, *Cytoplea?* sp., *Zoellneria eucalypti*, Ascomycete 1, Micelio estéril GRN y *Macrophoma smilacina*.

Se analizaron las poblaciones y comunidades fúngicas en función de los estadios de las hojas y las estaciones del año.

-1982, GODEAS Estudió la actividad y las poblaciones fúngicas durante la colonización de la hojarasca de *Pinus taeda* en un bosque ubicado en una isla en el Paraná de las Palmas. Se aplicaron los siguientes métodos: 1) Lavado y siembra de trozos de hojas; 2) Placa de agar de Jones y Mollison (1948), de Thomas et al. (1965) y de Bååth y Söderström (1979) para evaluar el micelio presente en las muestras midiendo el largo hifal en un caso y el diámetro hifal en otro; 3) Transformación de volumen en peso de micelio por gramo de peso seco de muestra, utilizando la medida del diámetro hifal (Saito, 1955).

En otoño se obtuvieron los menores valores para cantidad de micelio debido posiblemente a autólisis de hifas y/o ingestión de éstas por los insectos.

Una vez en el suelo las hojas fueron colonizadas por organismos del suelo, alcanzando su máximo en invierno. En primavera y verano el largo del micelio decreció a medida que el sustrato se consumió. El largo hifal no se relacionó ni con la temperatura ni con la humedad, en cambio sí con el tiempo transcurrido desde la caída de las hojas.

Las cepas que se aislaron fueron: *A. alternata*, *A. tenuis*, *A. pullulans*, *C. herbarum*, *E. purpurascens*, *F. lateriticum*,

F. oxysporum, *F. sambucinum*, *Pestalotiopsis oxyanthi*, *Trichoderma viride*, *T. hamatum*, *T. harzianum* y *T. koningii*.

Las estaciones con mayor número de cepas tuvieron menor diversidad específica. El máximo valor de diversidad se alcanzó en invierno y el mínimo en otoño.

Aureobasidium pullulans sólo se lo encontró en otoño. *Cladosporium herbarum* y *Alternaria alternata* tuvieron mayores frecuencias en otoño, decreciendo a lo largo del año. *A. tenuis* fue abundante en la hojarasca, su frecuencia decreció en invierno y primavera y aumentó en verano.

Las especies de *Trichoderma*, características del suelo, aumentaron sus frecuencias en invierno cuando decreció la frecuencia de la flora típica de la hoja. *P. oxyanthi* fue probablemente la especie más importante, con frecuencias altas durante todo el año. También presente en hoja viva, no se vio afectada por los cambios que implica la caída de las hojas. *E. pupurascens* tuvo un período inicial estacionario y luego su frecuencia aumentó.

En el área del muestreo los cambios estacionales no fueron factores limitantes en la colonización de la hojarasca por los hongos. Los cambios se debieron a especies fúngicas presentes en el suelo que son capaces de colonizar las hojas recién caídas y de ese modo contribuir a la descomposición y posterior incorporación al suelo.

-1983, GOURBIERE Utilizó el método de esterilización superficial con cloruro de mercurio al 0,1% para determinar la micoflora interna de *Abies alba* en distintos estadios de

descomposición. Los primeros colonizadores de la hojarasca fueron los saprófitos primarios específicos como *Cytospora* sp., *Dothichiza* sp., *Rhizosphaera* sp. y *Lophodermium* sp. El interior resultó colonizado por *Thysanophora* sp., *Marasmius* sp. y *Unguicularia* sp.

De la superficie de las hojas se aislaron los saprófitos primarios comunes *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., y *Epicoccum* sp. y los hongos típicos de suelo *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Mortierella* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Verticillium* sp., *Acremonium* sp., *Calcarisporium* sp., *Beauveria* sp. y *Chaunopycnis* sp.

-1983, GAMUNDI, ARAMBARRI, FRANGI Y SPINEDI Estudiaron la variación estacional de la micoflora en la hojarasca de *Nothofagus dombeyi*, "coihue", especie perennifolia de clima templado húmedo que tapiza las laderas de los Andes Patagónicos en el Hemisferio sur hasta 900 metros.

El trabajo contempló dos aspectos: florístico y miccerológico. Determinaron 134 especies de las cuales 70% son Hyphomycetes, 16% Coelomycetes, 7% Ascomycetes, 4% Zygomycetes, 2% Basidiomycetes y 1% Myxomycetes.

Compararon las características climáticas de los dos lugares de muestreo y relacionaron con los resultados obtenidos en cuanto a la riqueza de especies y la frecuencia.

Describieron la micocenosis: especies presentes todo el año, invernales, primaverales exclusivos, primaverales preferentes, primaverales estivales, estivales exclusivos y otoñales.

-1984, MISHRA Y DICKINSON Estudiaron el comportamiento de varios hongos del filoplanio de *Ilex aquifolium* (holly) en un invernadero en Northumberland, Inglaterra.

Para preparar el inóculo cortaron discos de hojas de 6mm de diámetro evitando nervaduras y márgenes, las esterilizaron por radiación, inocularon por pulverización con distintos hongos de concentración conocida. Luego de la incubación, las hojas se retiraron y agitaron en agua destilada 20 minutos. En la solución sobrenadante se determinó el número de esporas o células con un hemocitómetro.

Para estudiar la colonización de las hojas, inocularon ramas con hojas vivas y hojarasca con suspensiones de *A. alternata*, *C. cladosporioides*, incubándolas y luego de 7 días hicieron: 1) Improntas en nitrato de celulosa (Dickinson, Watson y Wallace, 1974); 2) Observación con MEB de la película obtenida; 3) Suspensión en agua de discos de hojas, agitación y cultivo de alícuotas de la misma en PDA, OA y celulosa agar. Incubación y conteo de los propágulos obtenidos.

Para determinar el efecto de la humedad inocularon discos de hojas verdes y de hojarasca y los sometieron a distintos niveles de humedad (80, 95, 100%). Luego se sacaron periódicamente y se suspendieron en agua destilada, agitándose y en el sobrenadante se determinó número de esporas.

El efecto de la lixiviación se determinó manteniendo sumergidas durante 24 hs tanto hojas verdes como senescentes

en una corriente continua de agua fría. Se cortaron discos de estas hojas y de testigos sin lixiviar, se esterilizaron con radiación gamma y se inocularon con los hongos en estudio. Luego de incubar se determinaron las esporas producidas por el método ya mencionado.

Para evaluar el efecto de la urea se colocaron en cámara húmeda discos de hojas verdes y de hojarasca esterilizados. Se agregaron gotas de distintas concentraciones de solución de urea en agua, se inoculó con las cepas estudiadas. Se incubó y se determinó por conteo las esporas producidas.

Se hicieron estudios de competencia: para ello se cortaron discos de hojas jóvenes, maduras y de hojarasca. Se colocaron en cajas de Petri con arena saturada orientados unos cara abaxial y otros adaxial. Se pulverizaron con suspensiones de las distintas cepas aisladas o en combinaciones de dos, se incubaron y luego periódicamente se hicieron determinaciones como ya se mencionó.

Los autores arribaron a las siguientes conclusiones: *Sporobolomyces roseus* se desarrolló bien en hojas vivas con valores de humedad relativa próximos a 100%. El descenso posterior podría deberse a lisis de sus células provocados por el crecimiento de poblaciones bacterias.

Aunque algunos autores encontraron efecto estimulante al agregar sacarosa o extracto de levaduras (Bashi y Fokkema, 1977), en este trabajo se vio que *S. roseus* crecía mejor en hojas lixiviadas, posiblemente debido a la remoción de inhibidores que limitaban su crecimiento en hojas verdes. El

agregado de nitrógeno también tuvo un efecto estimulante.

Este organismo tiene mayor actividad en las hojas jóvenes próximas al ápice, en las maduras crece intensamente pero no se lo aisló de la hojarasca. Por lo tanto es un verdadero habitante del filoplano. En la hojarasca puede sobrevivir en invierno, estación en la que es poco frecuente en las hojas verdes.

Con respecto a *Aureobasidium* sp. se vio que se multiplica intensamente en hojas verdes lixiviadas, pero a igual que *S. roseus* las poblaciones son de vida corta y no pueden competir frente a otros hongos.

C. cladosporioides se reprodujo bien tanto en hojas verdes como en hojarasca, lo favorece la alta humedad, la lixiviación y el aporte moderado de nitrógeno; no es un buen antagonista y lo inhiben otros hongos del filoplano.

A. alternata tradicionalmente considerado un habitante del filoplano, en este estudio no se reprodujo asexualmente, ni siquiera con humedad alta. Dio pocos conidios tanto en hoja viva como en hojarasca. También fue un mal antagonista. Probablemente su falta de habilidad para esporular en el filoplano está compensada por el hecho de que puede actuar como parásito e instalarse en tejidos herbáceos (Dickinson, 1981).

Acremonium strictum más frecuente en hojas senescentes o recién caídas produjo más conidios en hojas lixiviadas, con agregado de urea y humedad a saturación. No fue un buen competidor y lo inhibieron otros hongos de las hojas.

-1984, ARAMBARRI Y GAMUNDI; ARAMBARRI Y SPINEDI continuaron el estudio de la micoflora de la hojarasca de *Nothofagus obliqua* (roble pellín) y *N. pumilio* (lenga).

-1985, CABRAL Estudió las poblaciones fúngicas de la filosfera de *Eucalyptus viminalis* en una plantación ubicada en la localidad de Ramallo, provincia de Buenos Aires a 500m del río Paraná. Se tomaron muestras de hojas jóvenes, maduras, senescentes, secas y de la hojarasca en las diferentes estaciones del año.

Se aplicaron los siguientes métodos: 1) Lavado de hojas según Harley y Waid (1955), Kendrick y Burges (1962) con agregado de Tween 80 en los primeros lavados (Dickinson, 1965). El aparato utilizado es similar al de Parkinson y Williams (1961) y descrito por Godeas (1977). Los trozos de hojas lavados se secaron en cajas de Petri con papel de filtro y luego se sembraron en medio de Cook (1954) con rosa de bengala; 2) Esterilización de hojas con solución de $HgCl_2$ 0,1% (Pugh y Buckley, 1971) más alcohol etílico (Hering, 1965; Ruscoe, 1971), lavados sucesivos con agua estéril, secado y sembrado; 3) Incubación en cámara húmeda, observación antes y después de la misma, aislación de las especies fértiles.

De los resultados que se obtienen surgen como habitantes del filoplano, con alta frecuencia y ampliamente distribuidos en los distintos tipos de hojas y estaciones *A. alternata*, *C.*

cladosporioides, *Epicoccum nigrum* y *Microsphaeropsis callista*. Siguieron a éstos con menor frecuencia y distribución *Fusarium* sp., *Phoma* sp. PH1 y *Pestalotiopsis oxyanthi*.

Por esterilización superficial surgen como endofitos con frecuencias altas y ampliamente distribuidos *Coccomyces martiniae* y *Coniothyrium* sp, con menor frecuencia *Zoellneria eucalypti* y un micelio estéril, GRN.

Macrophoma smilacina fue aislado por los dos métodos, el autor considera que es endofito pero con su crecimiento rápido compite con éxito con los hongos del filoplano.

Con respecto a las estaciones del año y los organismos del filoplano se da en otoño/invierno un pico y en verano una mínima. No obstante esto, cada especie presenta sus propias variaciones.

Con respecto a las distribuciones fúngicas y los tipos de hojas no hay una tendencia clara salvo en *A. alternata* que tiene frecuencia mínima en hojas jóvenes y un máximo en hojas secas, exceptuando en otoño que tiene frecuencias altas en todos los estadios.

Con respecto a los endofitos, *C. martiniae* y *Z. eucalypti* tienen mayor frecuencia en invierno y otoño. *Coniothyrium* sp., alcanza su máximo en verano y *M. smilacina* en primavera/verano. En relación a los estadios de la hoja se dan frecuencias bajas en hojas jóvenes, aumentando en las maduras y decreciendo en las hojas secas.

Por observación directa de las hojas se encontraron en

otoño/invierno el mayor número de especies esporuladas, corresponderían a especies endofitas, menos *Harknesia eucalypti*.

Basándose en la clasificación para los organismos de la filosfera propuesta por Leben (1965) y Dickinson (1976) y los conceptos de Pugh (1980), el autor de este trabajo propone una clasificación para los organismos no patógenos de la filosfera de *E. viminalis* en Ruderales, Residentes específicos y Residentes no específicos.

-1986, KAHLKI, KLOIDT Y LYSEK Estudiaron los hongos del filopiano de *P. sylvestris* en el oeste de Berlín. Muestrearon siete árboles, cada uno de ellos de distintas zonas, que representan las variaciones de las condiciones aéreas de esa ciudad. Seleccionaron hojas jóvenes y de dos años de una altura de 2m sobre el suelo. Cortaron en trozos pequeños y sembraron en agar extracto de malta, aislaron e identificaron las colonias. Para hacer fructificar las colonias estériles utilizaron diversos medios de cultivo, exposición a UV, variaciones de temperatura.

Aislaron 20 especies y 2 micelios estériles. La más frecuente fue *A. pullulans*, ninguna otra especie alcanzó más del 10% del total de colonias, las que obtuvieron menos del 1% se las consideró accidentales. Encontraron aumento de la infección con la edad de las hojas.

A. alternata, *Cytospora pinastri*, *Ceuthospora lauri*, *Epicoecium purpurascens*, *Phoma pomorum* y *Phomopsis* sp., fueron aisladas con mayor frecuencia de hojas viejas. *A.*

pullulans y *C. herbarum* no mostraron diferencias con la edad de la hoja. En cambio *Cytospora pinastri* y *Ceuthospora lauri* sí lo hicieron, probablemente debido a un aumento en la disponibilidad de nutrientes.

También compararon el filoplano de árboles ubicados en zonas urbanas y suburbanas, lo que implicó distinto nivel de contaminación del aire, como promedio anual de concentración de SO_2 . Encontraron menos microorganismos en zonas con alta contaminación salvo *A. pullulans* que no se ve afectada por la misma.

-1987, GODEAS Estudió la descomposición de hojarasca en bosque de *Pinus taeda*. Para ello aplicó el método de bolsas de descomposición que consiste en colocar hojarasca secada a temperatura ambiente y de peso conocido sobre la superficie del suelo. Se hicieron varias determinaciones y una de ellas es la biomasa fúngica por el método de la placa de agar.

Se obtuvieron los siguientes resultados: las hojas recién caídas tenían poco micelio $4,37 \pm 0,82 \text{ m/mg}$ de masa seca. En los primeros meses en el campo la biomasa fúngica aumentó lentamente. Entre noviembre y mayo del primer año se produjo un aumento notorio del largo de micelio de $4,28 \pm 0,89 \text{ m/mg}$ a $23,36 \pm 0,86 \text{ m/mg}$.

En la primera fase de descomposición y hasta que el porcentaje de humedad de la muestra llegó a 60%, el micelio estaba correlacionado con la humedad. Luego de estar en contacto un año la hojarasca con el suelo, la humedad de la misma permaneció entre $58,85 \pm 2,5$ y $69,34 \pm 2,4\%$, no obstante el

micelio varió, con un pico en otoño y decreció hacia el verano.

-1987, BARKLUD Estudió los endofitos de las acículas de *Picea abies* en el sur de Suecia. Se tomaron muestras de árboles jóvenes y sanos, de árboles jóvenes infectados con el patógeno *Gremmeniella abietina* y de árboles maduros con sintoma de pérdida de hojas.

El objetivo del estudio fue relacionar *Lophodermium piceae* con la edad de las hojas, tipo de "stand", estación y estado sanitario de los árboles.

Se utilizó el método de esterilización superficial, lavado y siembra.

La infección inicial de *L. piceae* a partir de esporas ocurre principalmente en la primera estación de crecimiento de las acículas de *Picea abies* y permanece como endofito asintomático por varios años, sin fructificaciones (ascocarpo o conidioma) ni síntomas de enfermedad evidente. Los ascocarpos se forman una vez que las hojas llegan al suelo.

La maduración de las hojas va acompañada por aumento en la incidencia de la infección por el endofito, que aumenta entre setiembre y noviembre y permanece sin cambios en invierno y primavera, de lo que se deduce que el crecimiento miceliano del endofito en invierno es muy lento.

La autora comparó la incidencia de *L. piceae* en un "stand" de plantas sanas, con respecto a otro con plantas sanas y enfermas (*G. abietina*). Sobre *L. piceae* no influyó la presencia de *G. abietina*. Es un habitante típico, no

patógeno, de *P. abies* y se duda que contribuya a la defoliación de los árboles. La variación en la incidencia no está relacionada con la infección por *G. abietina* y estaría relacionado con otros factores, posiblemente ambientales.

L. picea es una especie hospedante específica y domina la flora fúngica de la lámina de las hojas de *P. abies* y tiene el mismo patrón general de otros endofitos.

-1987, GAMUNDI, ARAMBARRI Y SPINEDI Estudiaron la sucesión de hongos en la hojarasca de *Nothofagus dombeyi* en el lago Gutiérrez y Península de Quetrihué. Los autores reconocieron que la sucesión se inicia en la hoja verde sobre la planta, pero en este trabajo se ha obviado esta etapa partiendo del piso del bosque. El método que utilizaron es la observación de hojas previamente esterilizadas e incubadas en trampas ubicadas en la hojarasca. Luego construyeron tablas sociológicas con los datos de presencia y frecuencia relativa de los hongos y los agruparon siguiendo la técnica de Mueller-Dombois y Ellenberg (1974).

Se reconocieron seis grupos sucesionales: el grupo I representa las especies pioneras de la sucesión sobre las hojas caídas en el piso del bosque y su principal componente fue *Zoellneria eucalypti*. El grupo II está integrado por *Coleophoma cylindrospora* y por *Cladosporium cladosporioides*, ambos saprófitos primarios. El grupo III no mostró distribución estacional, es de aparición discontinua, está compuesto por hongos de suelo invasores de la hojarasca como *Paecilomyces* sp. y *Acremonium* sp. El grupo IV integrado por

Trichocladium opacum es un saprófito primario agresivo y competitivo por su variada actividad enzimática. El grupo V formado básicamente por ascomycetes, a veces acompañados por hongos aeroacuáticos pueden considerarse saprófitos secundarios. El grupo VI está integrado por hongos de suelo y depredadores como *Monacrosporium* *gephyropagum* y *Mucor* *circinelloides*.

El estudio se realizó durante 4 años y 8 meses, periodo en el que sólo aparecieron 70% de los taxones determinados en la hojarasca natural.

Encontraron cierta coherencia entre los grupos sucesionales y los grupos estacionales estudiados en un trabajo anterior.

-1988, BERTONI Y CABRAL Estudiaron la comunidad endofítica de las hojas vivas de *Eucalyptus viminalis* usando métodos de cultivo, previa esterilización superficial. Las especies con mayor frecuencia fueron *Coniothyrium* sp., *Coccomyces* *martiniae* y *Mycosphaerella* sp. seguidos por *Macrophoma* *smilacina*, *Nigrospora* sp. y micelio estéril GRN. Los clasificaron en dos grupos: presentes en todos los tejidos de la hoja y restringidos a la lámina. La mayor infección coincidió con la lámina y la mitad basal de la hoja, seguido por la nervadura y el pecíolo y luego la mitad superior de la hoja.

Se postuló que la infección ha desarrollado con más probabilidad a partir de propágulos depositados que por infección sistémica.

Con respecto a la estructura de las comunidades endofíticas de las hojas de *E. viminalis*, los autores postularon la existencia en cada hoja de microcomunidades independientes con una estructura particular. Las microcomunidades se agruparon en cuatro modelos básicos, teniendo en cuenta para ello las especies involucradas y sus frecuencias. Estos modelos son independientes del genotipo del árbol y podrían asociarse con la idea de "unit-community" propuesta por Swift (1976).

-1988, FAIFER Y BERTONI Analizaron la interacción de algunos hongos de la filosfera de *Eucalyptus viminalis* utilizando: 1) el método de la película de celofán, con el que se testea el efecto de metabolitos y 2) cultivos enfrentados para detectar fenómenos de inhibición. Las combinaciones que realizaron fueron: a) endofitos vs. endofitos, b) epifitos vs. epifitos y c) endofitos vs. epifitos.

Los hongos de la filosfera que se incluyeron en este estudio fueron *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Nigrospora oryzae*, *Coccomyces martiniae*, *Coniothyrium* sp., *Macrophoma smilacina* y *Zoellneria eucalypti*.

Los resultados obtenidos mostraron que los endofitos de alta frecuencia tienen efectos antagónicos sobre los endofitos de baja frecuencia y los hongos del filo plano, mientras que los hongos epifitos tienen efectos leves. Los autores consideran que estas relaciones y las condiciones del microhabitat explicarían la posición relativa tanto de los

hongos endofitos como de los epifitos de la hoja.

-1989a, LEGAULT, DESSUREAULT Y LAFLAMME investigaron la micoflora epífita de las hojas sanas de *Pinus banksiana* y *P. resinosa* en seis estaciones de Quebec.

El número de especies fúngicas diferentes aumentó con la edad de las hojas y en *P. resinosa* se encontraron más hongos.

Las especies más frecuentes fueron los saprófitos primarios comunes no específicos de *Pinus* como *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *E. purpurascens* y *Hormonema dematioides*. Se citaron por primera vez para el filoplano del género *Pinus*, *Aureobasidium microstictum*, *Penicillium brevicompactum*, *P. spinulosum* y *Pithomyces chartarum*.

-1989b, LEGAULT, DESSUREAULT Y LAFLAMME Estudiaron la naturaleza y distribución de la micoflora endofita de hojas sanas de *P. resinosa* y *P. banksiana* en "stands" infectados con el patógeno *Brunchorstia pinea*. El porcentaje de colonización fue 68% para *P. banksiana* y 89% para *P. resinosa* y más altos en "stands" densos. Aumentó con la edad de las hojas, pero la orientación no influyó.

En *P. banksiana* se encontraron dos endofitos distintos en las acículas mientras que en *P. resinosa* hasta siete. No se aisló el patógeno *B. pinea*.

En el caso de *P. banksiana* la micoflora endofítica casi se limitó a *Coccomyces* sp. mientras que en *P. resinosa* los principales colonizadores fueron tres especies de *Leptostroma*.

-1990, PANDEY llevó adelante el estudio cuali y cuantitativo de las comunidades fúngicas del filoplano de *Psidium guajaba* en una plantación de 12 años en Varanasi, India. Analizó patrones estacionales y relacionó con la edad de las hojas. Se tomaron muestras a 5 pies de altura, de ramas internas y periféricas de la copa, de 5 edades diferentes.

Se aplicaron los siguientes métodos: 1) Método de placas de dilución (lavado de hojas y siembra de diferentes diluciones de la suspensión); 2) Siembra de hojas lavadas y 3) Cámara húmeda.

En los resultados mencionaron pequeñas variaciones en las comunidades fúngicas de las hojas S_1 (en la yema), S_2 (recién desplegadas) y S_3 (hojas maduras) en la estación lluviosa y en invierno.

Se obtuvo el mayor número de especies fúngicas por cm^2 de hoja en invierno y en hojas senescentes y el mínimo en verano. El número promedio de hongos por cm^2 aumentó desde la apertura de la yema hasta la senescencia y al caer las hojas se observó descenso en las poblaciones en todas las estaciones.

Las yemas y las hojas S_2 estaban colonizadas por *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *C. cladosporioides*, *E. purpurascens*, cuyas frecuencias en verano eran bajas.

Las levaduras tanto blancas como rosadas fueron abundantes en invierno y en la estación lluviosa pero estuvieron ausentes en verano.

De las hojas senescentes se aislaron *Pestalotiopsis disseminata*, *Robillarda sessilis*, *Stachybotrys alternans*, *Stemphylium botryosum* y *Trichoderma harzianum*.

Algunos hongos se los aisló del filopiano con frecuencias altas independientemente de la estación y del tipo de hoja; tal es el caso de *A. alternata*, *A. niger*, *A. pullulans*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, *Drechslera australiensis*, *E. purpurascens*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *psidii*, *F. semitectum*, *Pestalotia psidii*, *Phoma psidii* y *Penicillium chrysogenum*.

En la estación lluviosa predominaron *A. pullulans*, *C. gloeosporioides*, *C. lunata* y *F. oxysporum*, mientras que en invierno predominaron *C. cladosporioides*, *Cephalosporium roseo-griseum*, *Nigrospora sphaerica* y *Pestalotia psidii*.

Por último algunas especies sólo se las aisló en determinadas estaciones.

-1991, ANDREWS Y HIRANO Recopilan las conferencias del 5^{to} Simposio Internacional sobre Microbiología de la Filosfera. Los temas tratados en el mismo fueron: Bacteriología, Micología, Microbiología Médica, Ecología, Fitopatología, Fisiología, Anatomía, Biología Molecular, Estadística, Aerobiología y Meteorología. Finalmente se hace referencia a la importancia del estudio de la Ecología microbiana de las hojas y se señala la dirección de futuras investigaciones.

-1992, CABRAL Y COLLANTES, los datos de frecuencia de la comunidad fúngica de la filosfera y las subcomunidades del filopiano y endofilo de *Eucalyptus viminalis* se sometieron a

análisis de cluster y análisis de correspondencia con el objeto de analizar la variación estacional y la influencia de las condiciones fisiológicas de las hojas.

Para estudiar la estructura de las comunidades y subcomunidades se utilizó el índice de diversidad, las estrategias de las especies y la densidad miceliana medida con SEM.

El análisis estadístico demostró que el filoplano depende de los cambios climáticos y el endofilo depende de las condiciones fisiológicas de la hoja. Mientras que el total de la comunidad de la filosfera resultó principalmente influenciado por el clima. La densidad miceliana del filoplano reveló que las condiciones fisiológicas de la hoja eran un factor importante en ese microhabitat. El estudio de estrategias dio resultados similares a los obtenidos por los análisis multivariados.

-1993, BERTONI, CABRAL, ROMERO Y DUBCOVSKY estudiaron la incidencia de endofitos fúngicos en especies sudamericanas del género *Festuca*. Investigaron principalmente en cariopse, pero también analizaron estructuras vegetativas como vaina y escapa floral.

Encontraron endofitos en la capa de aleurona del cariopse de ocho especies sudamericanas y una asiática de *Festuca*.

De las todas las poblaciones de *F. argentina* y *F. hieromyni*, previamente citadas como tóxicas, se comprobó que estaban infectadas con hongos endofitos (75-100%). Esta correlación entre la toxicidad y los endofitos fúngicos se comprobó

también en *F. arundinacea* (cultivada).

Encontraron correlación entre la presencia o ausencia de endofitos y la clasificación infragenérica de *Festuca*.

-1993, SIEBER-CANAVESI, SIEBER estudiaron la sucesión de las comunidades fúngicas en hojas maduras, senescentes y en descomposición de *Abies alba* en dos parcelas en Suiza. Tomaron muestras cada 2-3 meses de hojas verdes de dos edades, hojas parcialmente castañas, totalmente castañas y de la hojarasca. Las esterilizaron superficialmente y las incubaron en MEA, adicionado con terramicina.

Aislaron 120 especies de hojas verdes y más de 140 de la hojarasca. Clasificaron los organismos de acuerdo a su habitat en: 1) endofitos de hojas vivas; 2) colonizadores y endofitos de tejidos senescentes, hojas recién muertas y sujetas al árbol, tejidos de la hojarasca; 3) exclusivos de hojarasca.

Exophiala sp. y *Grovesiella abieticola* se los aisló exclusivamente de hojas vivas. *Cryptocline abietina* y *Gloeosporidiella* sp. se los aisló del grupo 1, pero también de hojarasca. Los principales representantes del grupo 2 fueron *Cytospora pinastri*, *Hormonema dematioides*, *Rhizosphaera oudemansii*, *R. macrospora* y *Leptostroma* sp. Este último grupo al que denominaron de transición fue reemplazado durante el primer año en la hojarasca por miembros del tercer grupo tales como *Thysanophora penicillioides*, *Rhizoctonia* sp., *Gliocladium penicillioides*, *Pseudomicrodochium* sp., *Cylindrocladium* sp. o *Coleophoma cylindrospora*.

Los patrones sucesionales de las poblaciones fúngicas se modificaron por las condiciones edáficas y de manejo del bosque.

3 IMPORTANCIA DE LAS INVESTIGACIONES SOBRE MICROBIOLOGIA DE LAS HOJAS

Los resultados de las últimas investigaciones demostraron que tanto los saprófitos de la superficie como los endofitos no patógenos tienen implicancia en la resistencia de las plantas a los insectos y patógenos, lo que implica que los patógenos de plantas pueden ser controlados por microorganismos que coexisten con ellos.

Las técnicas más empleadas de protección de plantas se basan en la aplicación de pesticidas. El uso frecuente y excesivo de los mismos ha dado muchos efectos laterales como residuos tóxicos en alimentos y pasturas, riesgo durante el manipuleo para la aplicación, eliminación de otros organismos no patógenos, contaminación del suelo y el agua (Weltzien, 1991)

Baker y Cook (1974) sugieren que una de las razones por las que la ecología microbiana fue dejada de lado es que el control biológico de los patógenos que atacan partes aéreas de las plantas está en competencia directa con el control por sustancias químicas de los patógenos de las hojas.

Los sistemas agronómicos orgánicos que cuentan con tanto auge en los últimos tiempos, principalmente por los efectos

laterales de los pesticidas, mencionados anteriormente, no tienen la alternativa de usar sustancias químicas y dependen más del desarrollo de sistemas de biocontrol para las enfermedades de las plantas. Esta situación impulsó el estudio de caminos potenciales para biocontrol de enfermedades de importancia económica y epidemiológica de plantas producidas por hongos (Weltzien, 1991).

La información acerca de la microbiología de todas las superficies de las plantas permitirá que el control biológico sea una alternativa factible ante la presencia de patógenos.

4 OBJETIVOS

En este trabajo nos fijamos como objetivo el estudio de la filosfera de *Pinus taeda* desde dos ángulos diferentes:

I. Determinar las diferencias en la distribución de los microorganismos en distintos sectores de la hoja, base centro y ápice, tanto cuantitativamente como en la composición, tratando de establecer correlación con la topografía y la anatomía foliar y el porcentaje de humedad de cada uno de los sectores.

II.a Analizar las variaciones cuantitativas y en la composición de las poblaciones fúngicas en relación a los estados de madurez de la hoja y a las distintas estaciones del año.

II.b Observar la colonización superficial.

II.c Establecer la secuencia de colonización fúngica.

II.d Relacionar los datos obtenidos con las variables climáticas de la región y del periodo de muestreo.

II.e Estudiar las comunidades fúngicas en relación a las estaciones del año y la edad de la hoja utilizando métodos descriptivos numéricos.

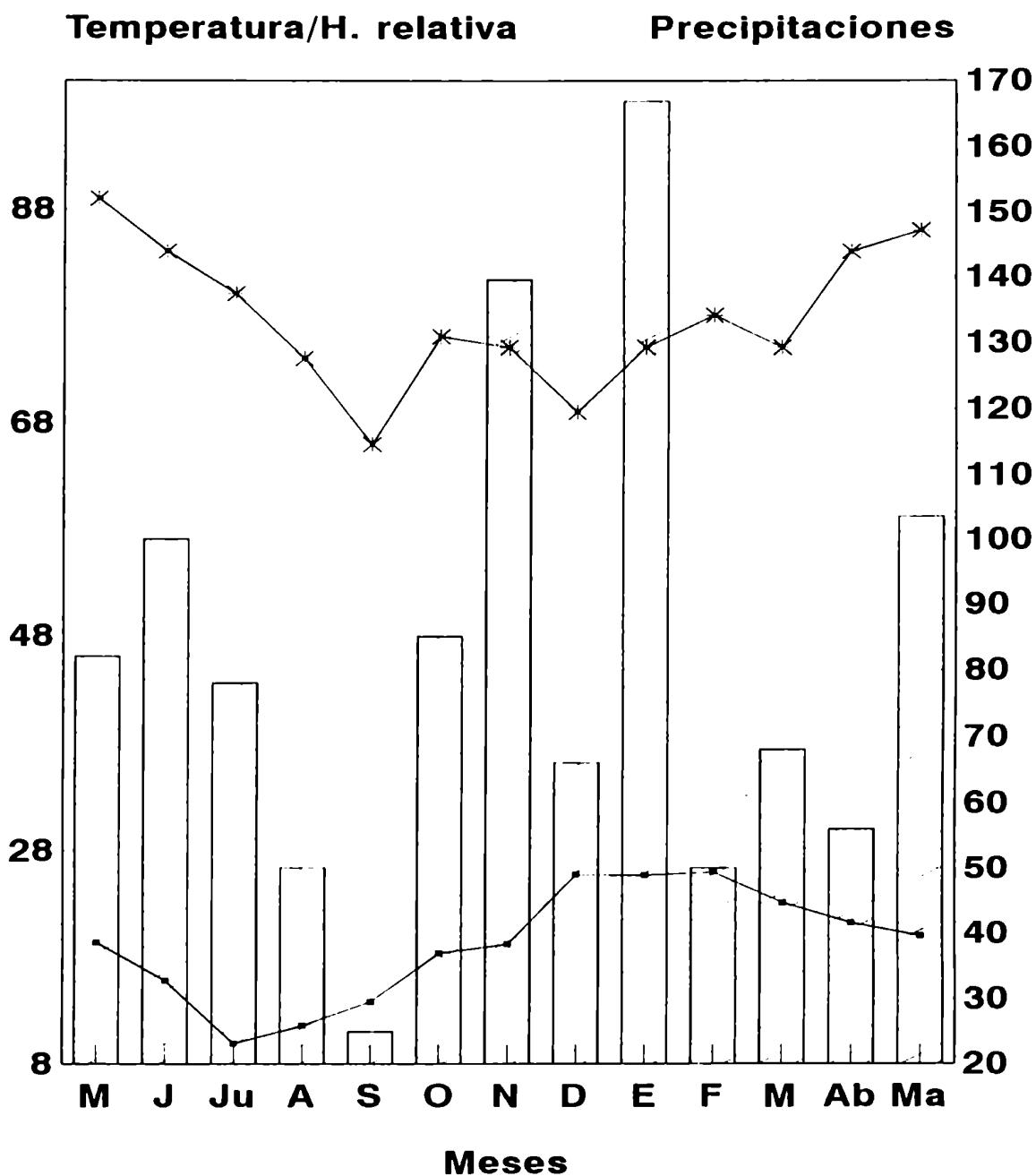
5 MATERIALES Y METODOS

5.1 CARACTERISTICAS DEL SITIO DE MUESTREO

5.1.1 UBICACION GEOGRAFICA: El muestreo se realizó en un pinar monoespecífico de *Pinus taeda* ubicado en la Estación Experimental INTA-DELTA en la provincia de Buenos Aires. El bosque de 2 ha de superficie y con una distancia entre árboles de 3,5m fue implantado en el año 1966, contando 14 años en el momento de iniciar el trabajo. (Latitud 34º 9' sur y Longitud 58º 57' oeste).

Desde el punto de vista fitogeográfico la provincia de Buenos Aires está situada en la región neotropical; en su extremo norte que incluye las islas del Delta del Paraná y la ribera del Río de la Plata, se halla un estrecho apéndice de la provincia paranaense perteneciente al Dominio Amazónico (Cabrera, 1968 parte I).

5.1.2 CLIMA: El Delta de la provincia de Buenos Aires posee un clima subtropical marítimo, caracterizado por inviernos con pocas heladas y lluvias todo el año (Papadakis, 1980). El índice climático de crecimiento es uno de los más altos del mundo. Temperatura media anual 16,12C; Precipitación media anual 999,5 mm. Los datos climáticos del período de muestreo están graficados en la Fig.1



-- T mensual ☐ Precipitaciones * Humedad relativa

FIGURA 1: Variación de la temperatura (°C) media mensual, precipitaciones (mm) y humedad relativa (%) durante el período de muestreo. Los datos de temperatura y precipitaciones fueron tomadas en la Estación Experimental INTA, Delta y la humedad relativa en la Estación San Pedro del Servicio Meteorológico Nacional

5.1.3 SUELO: Es una combinación de tres tipos, aluvial, gley húmico y semipantanosos (Cappannini, 1968).

5.2 CARACTERISTICAS DE LA PLANTACION

Pinus taeda pertenece a la subsección Australes del Género *Pinus* L. y es originaria del sureste de los EE.UU. (Little y Critchfield, 1969).

Golfari (1965) establece que el ritmo de crecimiento de las plantaciones de coníferas depende de las condiciones climáticas, edáficas y bióticas del lugar del ensayo, en relación con las exigencias propias de cada especie. Una conífera exótica necesita en su nuevo habitat un régimen de precipitaciones análogo al que rige en su lugar de origen para establecerse.

Con respecto al régimen de lluvia reinante en las áreas de origen de las coníferas se pueden definir tres grupos principales: a) Tipo mediterráneo, b) Tipo isohigro o uniforme y c) Tipo monzónico. El grupo b) reúne especies que necesitan lluvias uniformemente distribuidas durante el año y no toleran una estación seca larga y pronunciada; pertenecen a este grupo *P. ellioti*, *P. taeda*, *P. palustris*, *P. echinata*, *P. strobus*, *P. chiapensis*, *Araucaria angustifolia* y *Taxodium distichum*.

Golfari, (1965) delimita nueve regiones silvícolas en

América Latina basándose en la clasificación climática de Holdridge (1947), Koeppen (1948), Walter y Lieth (1960) y Papadakis (1962). De acuerdo con esta clasificación la región de nuestro país comprendida por el sureste y este costero de la provincia de Buenos Aires, el este y el sur de la provincia de Santa Fe, el sur de la provincia de Entre Ríos y el sureste y noroeste de la República de Uruguay resulta adecuada para el cultivo de *P. taeda* y *P. elliotti*; sobre todo en la zona del Delta del Paraná, con suelos hidromórficos, donde la disponibilidad de agua es muy elevada debido a la presencia de una napa freática poco profunda.

5.3 CARACTERISTICAS DE LA HOJA

Pinus taeda se caracteriza por tener hojas aciculares de 12-25cm de largo, dispuestas 2-3 por braquiblasto, triangulares o hemicirculares en corte transversal. Los estomas aparecen dispuestos en hileras longitudinales en todas las caras. La morfología interna muestra una epidermis cuya pared externa está cubierta por una cutícula, compuesta de sustancias cerosas. Debajo se encuentra la hipodermis biforme (Harlow, 1947), seguida por el mesófilo con las células características de paredes con invaginaciones. Los canales resiníferos (2-4) se encuentran en posición mediana (en el mesófilo) o más raramente medianos e internos (cerca del haz fibrovascular) rodeados o no de esclerénquima. El haz

fibrovascular está separado del mesófilo por la endodermis, cuyas células son de forma globular y con paredes externas algo engrosadas. Dos haces vasculares, cada uno con xilema y floema separados de la endodermis por tejido de transfusión. (Laguardia y Bottazzi, 1971).

El crecimiento de las ramas de *P. taeda* se realiza con una alternancia de periodos de crecimiento y de reposo que pueden visualizarse por las cicatrices que dejan al caer las catáfilas que protegen la yema apical. Dichas cicatrices delimitan en el tallo sectores portadores de hojas en distintos estados de madurez. Shelton y Switzer (1984) mencionaron que *P. taeda* retiene las hojas poco más de dos años.

5.4 MUESTREO

Se tomaron cada tres meses muestras de hojas jóvenes (de hasta 1 año de edad), maduras (1-2 años) y senescentes (más de 2 años) de diez árboles y de una altura que osciló entre los 2-5m colocándose cada tipo de hojas en una bolsa de la que luego se extrajeron, al azar las submuestras en el laboratorio.

El período de muestreo se extendió desde mayo de 1980 a marzo de 1981 y desde mayo de 1985 a marzo de 1986. Siendo las fechas de los muestreos 12-5-80, 20-8-80, 20-11-80, 6-3-81, 5-85, 8-85, 12-85 y 3-86.

5.5 HUMEDAD DE LAS MUESTRAS.

Se determinó el porcentaje de humedad de las muestras de hojas para verificar si su variación está relacionado con los metros de micelio y/o el número total de colonias aisladas. Para ello se colocó aproximadamente 2gr de material de cada submuestra en pesafiltros tarados, se llevó a estufa a 105°C hasta peso seco constante y por diferencia de peso se calculó el porcentaje de humedad y el peso seco de las submuestras.

5.5.1 EN DISTINTOS SECTORES DE LA HOJA.

Se tomaron hojas maduras, dividiéndose las mismas en tres sectores: apical, basal y central. La zona apical corresponde a los 2-3 primeros milímetros y la basal a la zona cubierta por las catáfilas. Se colocó aproximadamente 2 gramos de material de cada sector en pesafiltros y se calculó por triplicado el porcentaje de humedad.

5.5.2 EN DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ Y EN DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO.

Se tomaron hojas jóvenes, maduras y senescentes, cada tres meses, coincidiendo con las estaciones del año. Se cortó la porción central de las mismas y se colocó aproximadamente 2

gramos de material de cada tipo de hoja en pesafiltros para calcular el porcentaje de humedad por triplicado.

5.6 OBSERVACIONES CON MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO

Con esta técnica se observó el distinto grado de colonización superficial de cada cara de las acículas, abaxial y adaxial. El material se deshidrato por pasaje en una serie de alcoholes de graduación creciente 50%, 70%, 90%; luego se lo fijó en placas de aluminio para su metalizado y observación en el Servicio de Microscopía Electrónica del Instituto de Ecofisiología Vegetal del Conicet.

5.6.1 EN DISTINTOS SECTORES DE LA HOJA.

Se tomaron muestras (12-5-80) de hojas maduras dividiéndose en sectores apical, basal y central, procediendo según 3.6, se prepararon 3 replicas de la cara abaxial y 3 de la adaxial de cada sector para observar con MEB.

5.6.2 EN DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ Y DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO.

Se tomaron hojas jóvenes, maduras y senescentes cada tres meses desde mayo de 1985 a marzo de 1986. Se cortó el sector

central de las mismas y se procedió según 3.6, preparándose 3 replicas de la cara abaxial y 3 de la adaxial de cada tipo de hoja y en cada mes de muestreo.

5-7 ANALISIS QUIMICO DE LAS HOJAS

Se realizaron determinaciones de carbono, hidrógeno, nitrógeno y cenizas con el objeto de correlacionarlas con el grado de colonización fúngica.

Las determinaciones fueron realizadas por UMIFOR, Unidad de microanálisis y métodos físicos en química orgánica del CONICET en el Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

5.7.1 EN DISTINTOS SECTORES DE LA HOJA.

Se tomaron muestras de los distintos sectores de la hoja madura (base, centro, ápice), en el mes de mayo de 1985. Se secó en estufa y se molió en mortero aproximadamente 1 gr. de cada sector, se rotuló y derivó a UMIFOR.

5.7.2 EN DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ Y EN DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO.

Se tomaron muestras de la porción central de las hojas en

diferentes estados de madurez y en las cuatro estaciones. Se procedió como en 5.7.1

5.8 ANATOMIA FOLIAR

Se tomaron muestras de hojas maduras en el mes de mayo de 1980, se fijaron en FAA y se realizaron cortes anatómicos a mano alzada de los distintos sectores de la hoja para analizar las diferencias anatómicas que podrían constituir diferentes barreras para la penetración fúngica. Se tiñó con violeta de cresilo.

5.9 ANALISIS DE LAS POBLACIONES FUNGICAS.

5.9.1 AISLAMIENTO DE ESPECIES FUNGICAS.

El objetivo es conocer las especies fúngicas activas en la filosfera de *P. taeda* para cada A) sector de la hoja y B) estado de madurez y estaciones del año.

Para el aislamiento se aplicó un método de lavado de hojas y siembra de las mismas en medio agarizado. Estas técnicas de lavado fueron inicialmente utilizadas para trabajos de suelo por Parkinson y Williams (1961). Williams et al. (1965) modificaron el aparato usado inicialmente y analizaron la eficiencia del método de lavado aplicándolo a distintos tipos

de suelos. Hering (1966) propuso un aparato con una válvula de control y un sifón que permite hacer lavados en serie en forma automática.

Bissett y Widden (1972) diseñaron un aparato similar al anterior pero con 10 columnas o cámaras de lavado (con sifón pero sin válvula de control de aire).

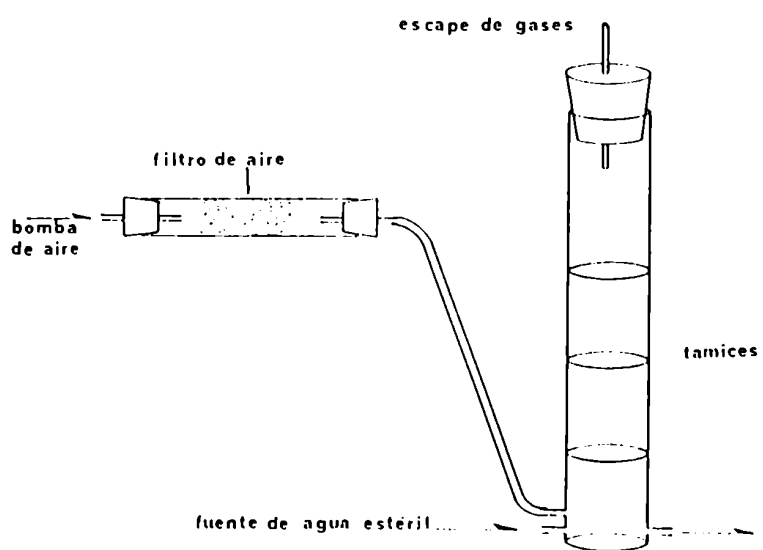
Godeas (1977) aplicó por primera vez en el país estos métodos para estudios ecológicos de suelo.

El uso de estos métodos se extendió luego a trabajos sobre partes aéreas de las plantas por Mishra y Das (1981), Gourbière (1975) y Cabral (1985).

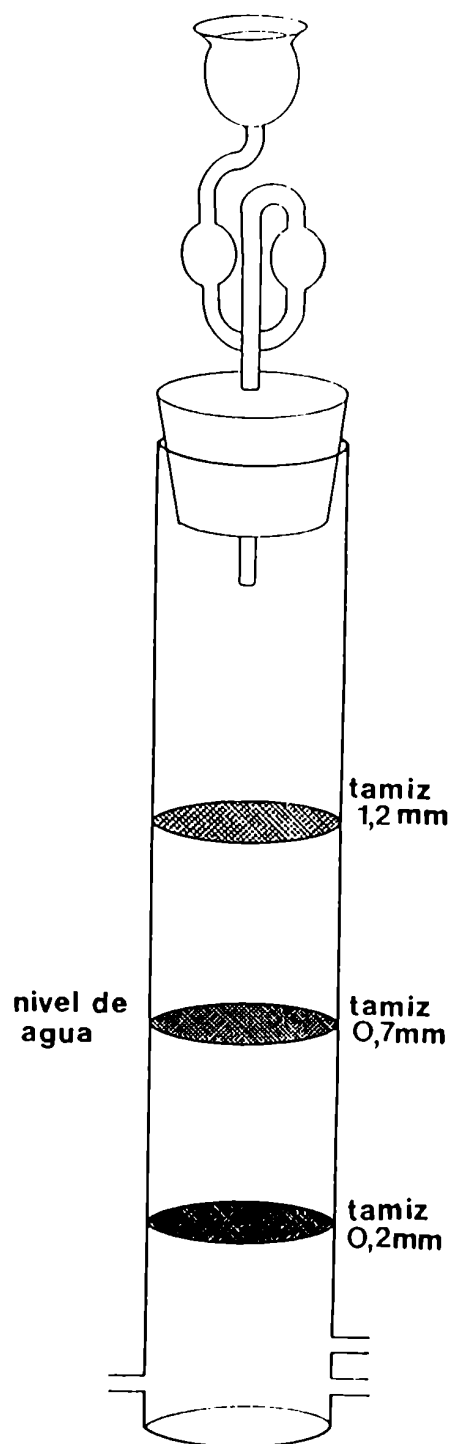
El objetivo de estos métodos es el aislamiento de las especies fúngicas en estado vegetativo o sea metabólicamente activas, que se logra eliminando la competencia con las especies altamente esporuladas y las esporas depositadas al azar sobre la superficie foliar.

El aparato utilizado en este trabajo (Fig.2) es un cilindro de acrílico de 5cm de diámetro por 35cm de largo cerrado en su parte inferior y provisto de tres aberturas, dos de las cuales son para entrada y salida de agua y la tercera para entrada de aire. En la parte superior consta de una tapa con orificio para salida de gases y que además mantiene la presión atmosférica en el sistema mientras se desagota el aparato. En su interior se colocan 2 tamices (de tamaño arbitrario para los objetivos de este trabajo) sobre un soporte y separados aproximadamente 10cm entre si. Cada tamiz se coloca entre dos discos de bronce y uno de goma.

**FIGURA 2: APARATO DE LAVADO DE MUESTRAS
PARA AISLAMIENTO DE HONGOS**



Esquema de armado



Entre la fuente de aire comprimido y la entrada al aparato de lavado se intercala un filtro de aire para evitar la contaminación que proviene del aire. Antes de ser usado el aparato las diferentes partes del mismo deben ser esterilizadas. Para ello el cilindro de acrílico junto con los tamices se deja lleno con solución de hipoclorito de sodio al 10% durante las 24 horas previas a su utilización; el filtro de aire se esteriliza en autoclave 20' a 1,5 atm. de presión.

El agua estéril se obtiene mediante un equipo de filtrado Millipore conectado en la red de agua potable.

Antes de proceder al lavado de las muestras debe eliminarse a fondo la solución de hipoclorito mediante sucesivos lavados con agua estéril.

Para determinar el número de lavados necesarios para eliminar las esporas presentes en la superficie foliar es necesario realizar una curva de lavado. Para ello se coloca una muestra de hojas (40 trozos) en el aparato de lavado sobre el tamiz inferior, se llena la columna hasta la mitad de su volumen con agua, se cierra el paso de agua y se abre la entrada de aire, manteniéndose un minuto en esas condiciones, luego se cierra el aire y se desagota el aparato recogiendo 3 alícuotas de 1ml cada una del agua de lavado y sembrándose las mismas en tres cajas de Petri con agar extracto de malta e incubándose a 20°C. Se repite este procedimiento renovando el agua 40 veces recogiendo y sembrando 3 alícuotas de 1ml cada 5 lavados. Se cuenta el

número de colonias que aparecen en cada caja y se grafica el promedio del número de colonias por ml de agua para los lavados testeados. Se realizan curvas de lavado para los distintos tipos de hojas muestreadas (Fig.3,4,5). De las curvas de lavado se llega a la conclusión que en las muestras de hoja Joven luego del lavado Nº 10, el número de colonias que aparecen es despreciable y no disminuye el número de las mismas al aumentar el número de lavados. De los datos obtenidos surge la necesidad de hacer 15 lavados en hojas jóvenes, 25 en hojas maduras y 35 en hojas senescentes.

5.9.1.1 DE DISTINTOS SECTORES DE LA HOJA.

Para el aislamiento de las especies fúngicas activas en los diferentes sectores de la hoja se seleccionan hojas maduras, de la misma edad. Para el sector apical se toman al azar 40 hojas, se corta la punta de las mismas 2cm aproximadamente y se las somete a 25 lavados según el procedimiento descrito; luego se los deja secar en cajas de Petri con papel de filtro esterilizadas durante 24 horas.

Posteriormente se cortan los 2-3mm más cercanos al ápice y se siembran 4 partículas por caja en extracto de malta más antibióticos, incubándose en estufa a 25°C.

La solución de antibióticos se prepara con 0,5gr de Estreptomicina (Lepetit) y 0,25gr de Clorhidrato de tetraciclina (Lepetit) en 100ml de agua destilada. Cada 100ml de medio de cultivo se agrega 1ml de solución de

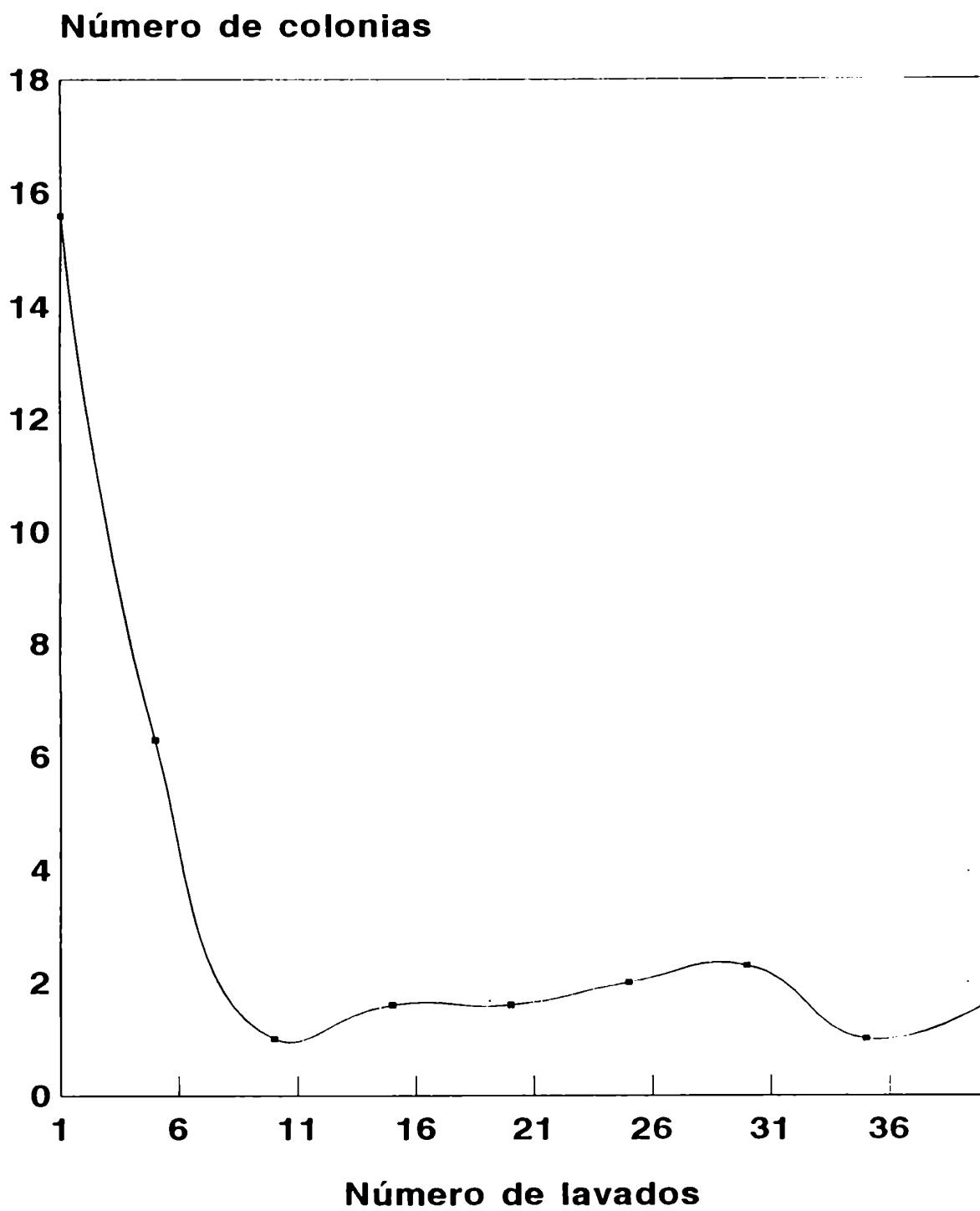


FIGURA 3: Curva de eficiencia de lavado en la hoja joven de *Pinus taeda*.

Número de colonias

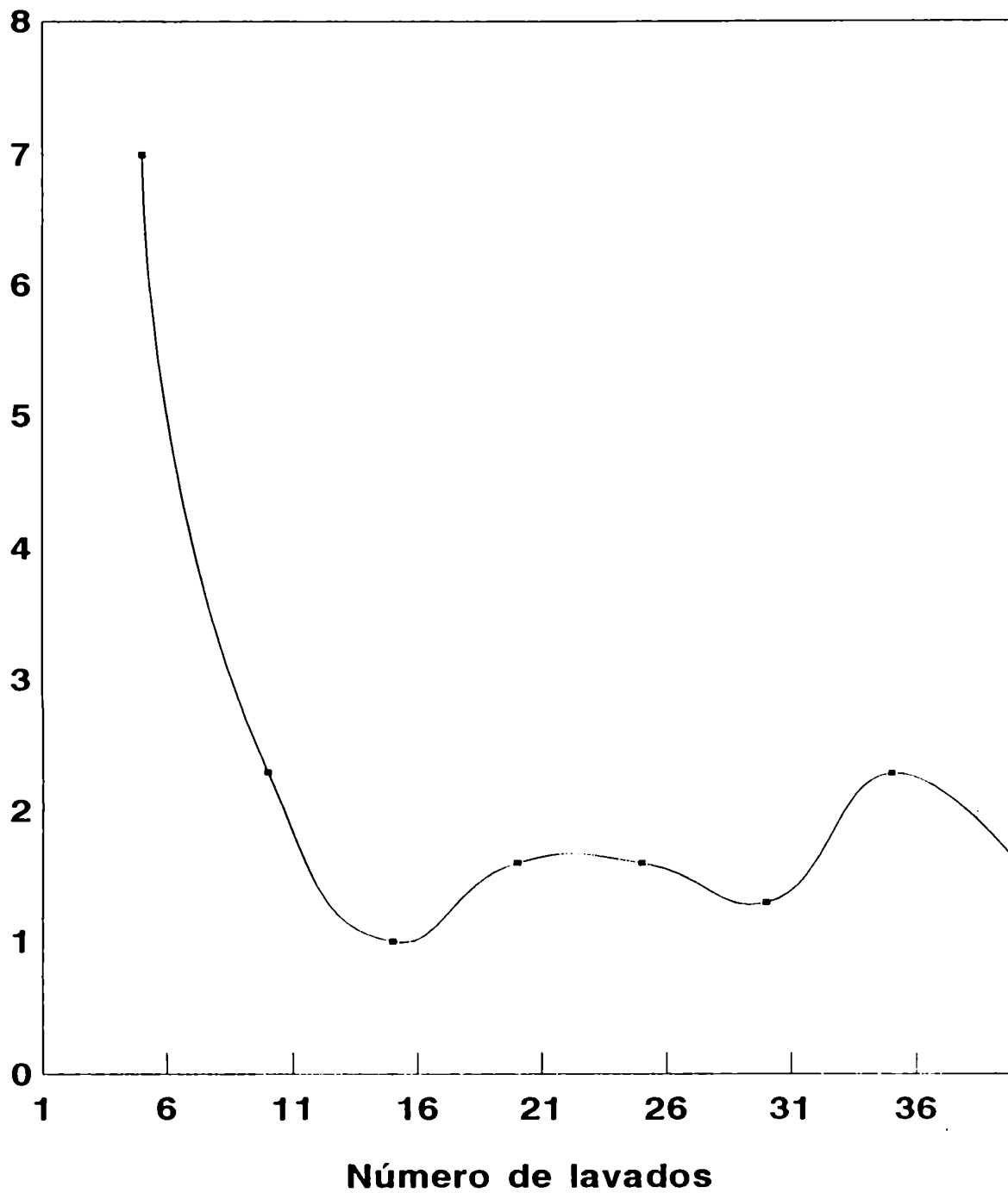


FIGURA 4: Curva de eficiencia de lavado en la hoja madura de *Pinus taeda*.

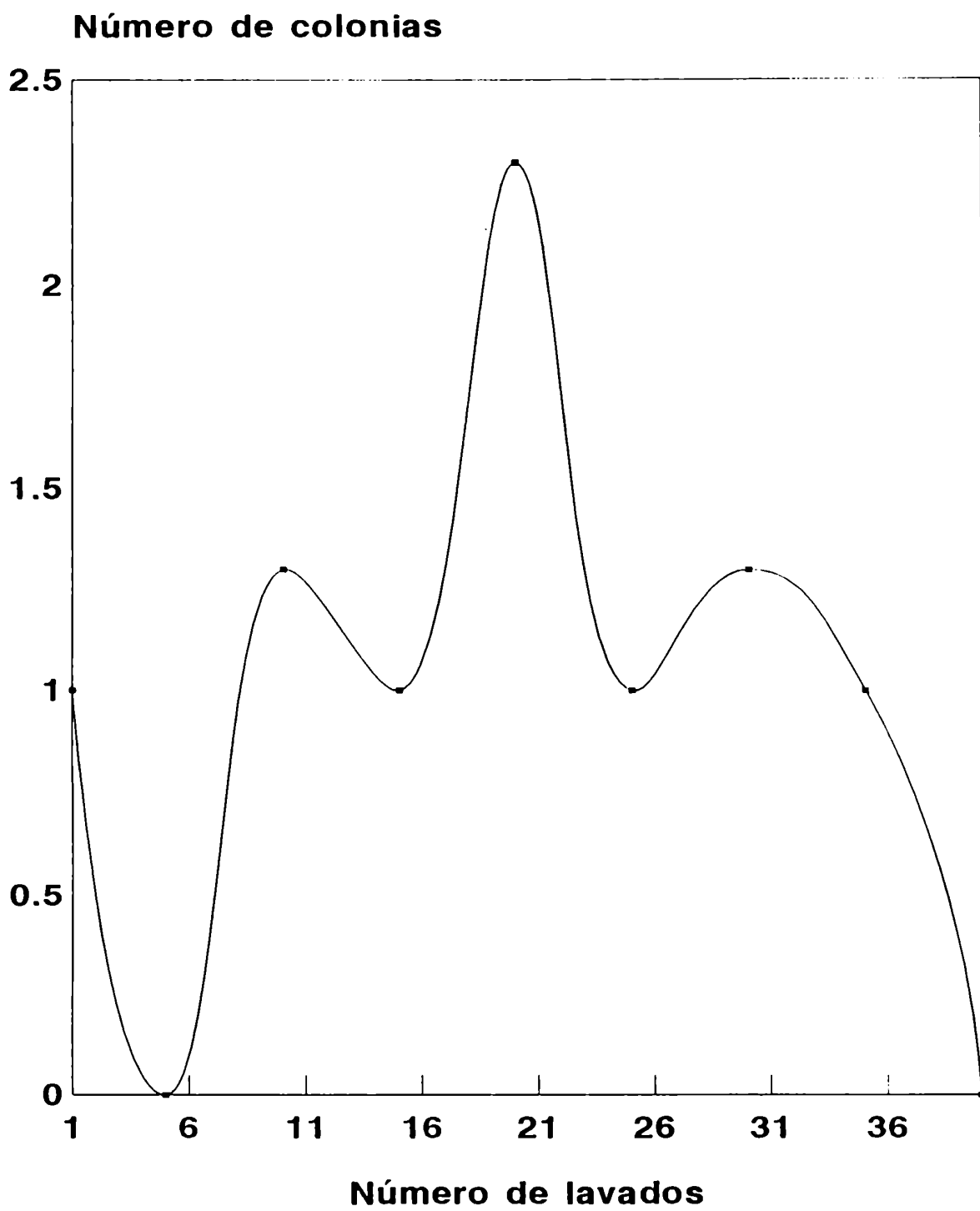


FIGURA 5: Curva de eficiencia de lavado en la hoja senescente de *Pinus taeda*

antibióticos. La inclusión de esta última en el medio de cultivo inhibe el desarrollo de bacterias.

Para el sector basal y central se utilizan 20 trozos basales en un caso y centrales en el otro que son lavados y secados según se describe en el párrafo anterior; luego se eliminan estérilmente los extremos y se cortan 2 trozos de 4mm² del segmento restante; se siembran 4 trozos por caja.

Las cajas se incuban a 20-25°C, las colonias resultantes sobre cada partícula se repican a tubos de ensayos con extracto de malta, se rotulan numéricamente para su posterior identificación taxonómica.

5.9.1.2 DE DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ Y EN DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO.

Para alcanzar el objetivo de esta parte del trabajo, que ya fue enunciado en 5.9.1 se tomaron muestras de hojas jóvenes maduras y senescentes en las cuatro estaciones del año. Dado que varios autores (Park, 1968; Godfrey, 1974; McBride y Hayes, 1977) coinciden en que el patrón de colonización es similar en años sucesivos de muestreo se tomaron muestras durante un año, desde el mes de mayo de 1980 hasta marzo de 1981.

En cada caso se procedió así: se tomaron al azar 20 hojas, se cortó un trozo de 2cm aproximadamente del sector medio de cada hoja; se procedió al lavado y secado tal como ya se

describió; se eliminaron estérilmente los extremos (2mm) y se cortaron dos trozos de 4mm² del segmento restante; se sembraron en extracto de malta más antibióticos (1%), (4 partículas por caja). Se incubaron a 20-25°C; las colonias resultantes sobre cada partícula se repicaron a tubos de ensayos con extracto de malta y se rotularon para su posterior identificación.

5.9.2 IDENTIFICACION DE LAS CEPAS

Las cepas aisladas en 5.9.1.1 y en 5.9.1.2 fueron gradualmente sembradas en cajas de Petri con diferentes medios para su estudio e identificación taxonómica. Los medios que se utilizaron fueron: agar avena (OA) (Clinton), Czapek (Dox) agar, agar papa glucosado (APG), agar papa sacarosa (APS) (Hawksworth, D.L.; B.C. Sutton and G. C. Ainsworth, 1983) y agar extracto de malta (Blakeslee, 1915).

Algunas cepas no fructificaron con ninguno de estos medios, en esos casos se ensayaron dos medios obteniéndose resultados satisfactorios. En uno de ellos se prepararon cajas con papel de filtro estériles y se volcó sobre ellas agar extracto de malta o agar avena. En otros casos se preparó una infusión de hojas de *P.taeda* y sobre la misma se incorporaron los componentes del agar extracto de malta.

También se intentó inducir la fructificación con luz UV cercana, según las recomendaciones de Leach (1971). Para ello

se utilizaron tubos de luz negra (15W, F15 T8 BLB, FL15 BLB con espectro continuo entre 320 y 420). Los tubos se colocaron en forma horizontal con una separación de 20cm y a una altura de 40cm de la superficie. Se emplearon ciclos de 12hs de exposición a UV cercano y 12hs de oscuridad.

Este régimen de iluminación se adapta a los requerimientos tanto de los hongos que necesitan luz y oscuridad (esporulación diurna) como a los capaces de esporular bajo exposición continua. La irradiación se inició 3-4 días luego de la siembra y se continuó durante el crecimiento y fructificación.

Para la identificación taxonómica se consultó entre otros a: Batista Chaves y Ciferri (1963), Booth (1971), Domsch et al. (1980), Ellis (1971, 1976), Gams (1971), Hermanides-Nijhof (1977), Hughes (1967), Hughes y Sugiyama (1972), Punithalingam (1981), Raper y Fennell (1965), Sleyaert (1961) y Sutton (1980).

5.9.3 DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE CADA ESPECIE FUNGICA.

El objetivo es conocer cuáles son por su mayor frecuencia las especies más importantes ya sea para cada sector de la hoja, cada estado de madurez o cada estación del año. Para ello luego de identificar taxonómicamente todas las cepas aisladas se calculó tanto para 5.9.1.1 como para 5.9.1.2 y para cada especie:

F = Frecuencia de aparición de cada sp.

$$F = \frac{\text{número de veces que aparece una sp.} \times 100}{\text{número total de trozos de hojas}}$$

5.9.4 DETERMINACION DEL TOTAL DE COLONIAS.

El objetivo es ver cuál es el sector, el estado de madurez o la estación del año en que las acículas están más colonizadas; para ello luego de aisladas todas las cepas y antes de su identificación taxonómica se calculó el número total de colonias sobre cada submuestra.

5.10 LONGITUD DE MICELIO.

El objetivo es lograr una estimación cuantitativa de la cantidad total de micelio presente sobre y dentro de los tejidos de la hoja expresada en metros por gramo de peso seco de hoja.

Jones y Mollison (1948) propusieron una metodología para estimar cuantitativamente los microorganismos del suelo. Suspendieron una cantidad conocida de suelo en agar agua fundido, una gota de la suspensión la hicieron solidificar en un hemocitómetro; la película que se obtuvo fue coloreada y

montada en forma permanente. Los preparados obtenidos se observaron al microscopio en cuyo ocular se incorporó un lente provisto con cuadrícula de 2mm. Realizaron conteo de microorganismos o fragmentos de micelio en 20 áreas del microscopio. También pudieron medir la longitud del micelio con un ocular graduado y cámara clara. Los datos obtenidos se expresaron por gramo de suelo, teniendo en cuenta la concentración inicial y el volumen empleado.

Thomas, Nicholas y Parkinson, (1965) enunciaron y analizaron las posibles fuentes de error del método anterior, recomendando el uso de una pesa de 5gr sobre el cubre del hemocitómetro para evitar que el grosor de la película sea mayor que 0,1mm y provoque sobrestimaciones de micelio. Nicholas y Parkinson, (1967) compararon los diferentes métodos empleados en la determinación de cantidad de micelio en muestras de suelo y concluyeron que el método de la película de agar es el más exacto.

Vieser y Parkinson (1975) modificaron el método anterior para su aplicación en estudios de hoja viva u hojarasca, recomendaron el empleo de una licuadora 3" a 10.000 rpm. para desmenuzar el material de muestra que tanto el micelio interno como el superficial pueda estimarse.

Para evitar la laboriosa medición de filamentos, Olson, (1950) propuso un método para estimar la longitud de algas filamentosas basado en el conteo de las intersecciones de los mismos con una grilla cuadriculada que se incorpora al ocular del microscopio, método que también fue usado para calcular

la longitud de micelio.

En este trabajo se procedió de la siguiente forma: inmediatamente después de la recolección se fijó 1gr de material de cada submuestra y por triplicado en 50ml de fijador de Bouin Holland, manteniéndose en estas condiciones hasta el momento de procesar. Se licuó junto con 50ml de agua; 30ml de esa suspensión se mezcló con 30ml de agar oxoid Nº3 al 1,5% (esterilizado). Se prepararon las películas de agar con 1ml de la mezcla anterior pipeteada y volcada sobre el hemocitómetro (cámara de Neubauer) colocando luego un cubre y una pesa de 5gr siguiendo el método de Jones y Mollison, (1948) y las modificaciones de Thomas, Nicholas y Parkinson, (1965); Visser y Parkinson, (1975) y Domsch et al., (1979). Una vez solidificadas las películas de agar se montaron con gelatina/glicerina.

Se prepararon 30 películas de agar por submuestra y se calculó la longitud de micelio presente siguiendo el método de la intersección de Olson, (1950) en un microscopio con contraste de fase en cuyo ocular se incorporó una grilla cuadrículada y con 500 aumentos.

Para calcular metros de micelio por gramo de peso seco de material se aplicó la siguiente fórmula:

$$m = \frac{\text{Nº cortes} \times \text{valor } 1\% \times 0,786 \times 1000}{\text{gr} \times \text{peso seco} \times \text{V de cámara} \times \text{aumento} \times \text{V de sol.}}$$

Nº cortes = Nº de intersecciones del micelio tanto con las líneas horizontales como con las verticales de la cuadrícula.

Valor 1% = 23,333 M = 0,02333 mm

0,786 = cte = $\pi/4$.

V = Volumen de la cámara (una cuadrícula) = 0,0054442 mm³

5.10.1 EN DISTINTOS SECTORES DE LA HOJA

Se tomaron hojas maduras, se dividieron en sectores apical, basal y central. Se colocó 1 gramo de cada sector en frascos con 50 ml de fijador de Bouin Holland, por triplicado. Se procesó según 5.10 y se prepararon 30 placas de agar de cada sector.

5.10.2 EN DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ Y DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO.

Se tomaron muestras de hojas jóvenes, maduras y senescentes cada tres meses, desde mayo 1980 a marzo de 1981. Se cortó el sector central de las mismas y se fijó 1 gramo de cada tipo de hoja en 50 ml de fijador, por triplicado. Se procesó según 5.10 y se prepararon 30 placas de agar de cada tipo de hoja por estación.

5.11 CALCULO DE BIOMASA FUNGICA

En las películas de agar preparadas para calcular la longitud de micelio se hicieron 50 mediciones del diámetro hifal para cada submuestra (estaciones, estadíos). Se calculó el porcentaje de cada diámetro hifal en cada tipo de hoja y por estación. Con este dato y el de longitud de micelio se calcularon los metros de micelio correspondientes a cada diámetro hifal. Con la longitud y el diámetro hifal se calculó biovolumen (Bååth y Söderström, 1979).

diámetro

$$B = \pi \times \left[\frac{\text{diámetro}}{2} \right]^2 \times L$$

También se calculó la biomasa fúngica considerando la densidad de los hongos igual a 1,1 gr/ml y el peso seco igual a 20% según Hasebe et al. (1984)

5.12 ANALISIS DE LAS COMUNIDADES FUNGICAS.

Se entiende por análisis multivariado, la rama de la estadística y del análisis de datos que estudia e interpreta un conjunto de (vectores aleatorios) datos multivariados. Estos surgen al medir más de una variable sobre cada individuo, persona u objeto. Las variables pueden ser de tipo

Los datos multivariados se expresan normalmente en forma de matrices.

$$X =$$

.....
 $x_{p1}, x_{p2}, \dots, x_{pn}$

Tanto las variables como los individuos o casos pueden ser de varios tipos, ésto da matrices de datos "estructurados". Por ejemplo para las variables: especies fúngicas presentes y características ambientales y para los individuos o casos:

tipos de hojas, distintas especies arbóreas. Green (1979) trata las variaciones en la estructura de los datos.

En este trabajo se construyó una matriz básica de datos compuesta por 29 variables y 120 casos. Siendo las variables: las especies fúngicas aisladas y los casos: los estados de madurez de las hojas y las estaciones el año (Tabla 1).

Se excluyeron las variables con frecuencias menores al 5%.

A cada mes de muestreo corresponden 30 casos, 10 para cada tipo de hoja.

Las frecuencias de cada especie fúngica en cada estación y estadio se expresaron como un porcentaje del total de especies aisladas por cada caja de Petri.

Transformación de los datos: cuando las variables están medidas en distintas escalas o en los casos en que aunque estén medidas en la misma escala se tienen diferencias cuantitativas grandes, como es el caso de la abundancia de especies fúngicas. Unas pocas especies son muy abundantes y dominarían el análisis a expensas o detrimento de otras menos abundantes. Para estos casos se recomienda la transformación logarítmica (Kenkel y Booth, 1992). En este análisis se aplicó $\log(X+0,5)$

Medidas de asociación: el término asociación se refiere a cualquier medida de semejanza, similitud o distancia, diferencia, por ejemplo la correlación de 2 especies fúngicas basados en su co-ocurrencia. La asociación se puede medir entre todos los pares de variables y entre todos los pares de individuos o casos. La mayoría de los métodos multivariados

TABLA 1: MATRIZ BASICA DE DATOS

MyJ1	40	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
MyJ2	25	25	0	0	0	0	0	0	12.5	0	0	0	0	0	0	12.5	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
MyJ3	25	0	0	0	0	25	0	25	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
MyJ4	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
MyJ5	20	0	0	0	0	20	0	0	20	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
MyJ6	14.3	0	0	0	0	0	0	0	14.3	0	0	0	0	0	0	42.9	14.3	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
MyJ7	75	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
MyJ8	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
MyJ9	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
MyJ0	33.3	33.3	0	0	0	0	0	0	0	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
MyM1	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2								
MyM2	0	20	0	0	40	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2								
MyM3	20	20	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	20	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2								
MyM4	0	20	20	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2								
MyM5	0	20	20	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2								
MyM6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2								
MyM7	14.3	0	57.2	0	0	14.3	14.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2								
MyM8	0	0	0	0	0	0	0	33.3	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2								
MyM9	0	0	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	33.3	33.3	0	0	0	0	0	0	0	2								
MyM0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	40	0	0	0	0	
	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	2								
MyS1	25	25	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3								
MyS2	0	0	33.2	16.6	0	16.6	0	0	0	0	16.6	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3								
MyS3	25	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3								
MyS4	0	33.3	0	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	3								
MyS5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3								
MyS6	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3								
MyS7	0	0	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3								
MyS8	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3								
MyS9	0	0	50	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3								
MyS0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0

AgJ1 42.9 14.3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 14.3 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
AgJ2 20 20 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 20 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
AgJ3 12.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 12.5 12.5 0 0 0 37.5 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
AgJ4 75 0 0 0 0 25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
AgJ5 25 0 0 0 0 0 50 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
AgJ6 11.1 0 0 0 0 0 11.1 0 0 0 11.1 0 0 0 33.3 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
AgJ7 40 0 0 0 0 0 0 0 0 20 0 0 0 0 20 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
AgJ8 33.3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 33.3 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
AgJ9 20 0 0 20 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 40 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
AgJ0 75 0 25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
AgM1 50 25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 25 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
AgM2 66.6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 33.3 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
AgM3 50 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
AgM4 40 20 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 20 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
AgM5 50 25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 25 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
AgM6 66.6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 33.3 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
AgM7 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
AgM8 50 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
AgM9 20 20 0 0 0 20 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
AgM0 66.4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 16.6 0 0 0 16.6 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
AgS1 50 25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
AgS2 100 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
AgS3 100 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
AgS4 66.4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 16.6 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
AgS5 75 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
AgS6 75 0 0 0 25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
AgS7 100 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
AgS8 100 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
AgS9 100 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
AgS0 100 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3

NvJ1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 33.3 0 0 0 0 0 33.3 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
NvJ2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 100 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
NvJ3 0 0 0 0 0 0 25 0 0 0 0 0 25 0 0 0 50 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
NvJ4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 100 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
NvJ5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 100 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
NvJ6 0 0 20 0 0 0 0 0 0 0 0 20 0 0 0 40 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
NvJ7 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 50 0 0 0 50 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
NvJ8 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 20 0 40 0 0 0 40 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
NvJ9 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 66.6 0 0 0
0 0 0 0 33.3 0 0 0 0 0 0 1
NvJ0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 100 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
NvM1 20 20 20 0 0 0 0 0 0 0 20 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
NvM2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 25 0 0 0 50 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
NvM3 28.6 0 14.3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 14.3 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
NvM4 16.6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 33.2 0 0 0 16.6 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
NvM5 0 0 40 0 0 0 0 0 0 0 20 0 0 0 0 0 20 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
NvM6 100 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
NvM7 25 0 12.5 0 0 0 0 0 0 0 0 12.5 0 0 0 12.5 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
NvM8 49.8 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 16.6 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
NvM9 33.2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 16.6 0 0 0 16.6 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
NvM0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 40 0 20 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
NvS1 28.6 0 0 0 0 0 0 14.3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
NvS2 33.2 16.6 0 0 0 0 0 0 16.6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
NvS3 0 50 25 0 0 0 0 0 0 25 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
NvS4 0 25 25 0 0 0 25 0 25 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
NvS5 0 16.6 16.6 0 0 0 16.6 0 16.6 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
NvS6 33.2 16.6 16.6 0 0 0 0 0 0 16.6 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
NvS7 0 20 40 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
NvS8 0 20 0 0 0 0 0 0 20 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
NvS9 16.6 16.6 16.6 0 0 0 0 16.6 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
NvS0 50 0 0 25 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3

MzJ1 0 16.6 0 0 0 0 0 0 33.2 0 33.2 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
MzJ2 0 11.1 0 0 0 0 0 0 11.1 0 33.3 0 0 0 33.3 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
MzJ3 0 0 0 0 0 0 11.1 0 0 0 33.3 0 0 0 44.4 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
MzJ4 0 16.6 0 0 0 0 0 0 16.6 0 33.2 0 0 0 16.6 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
MzJ5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 50 0 0 0 37.5 0 0 0
0 12.5 0 0 0 0 0 0 0 1
MzJ6 0 60 0 0 0 0 0 0 0 20 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 20 0 1
MzJ7 0 33.2 0 0 0 0 0 0 16.6 0 33.2 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 16.6 0 0 0 0 1
MzJ8 0 0 12.5 0 0 0 0 0 0 37.5 0 0 0 50 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
MzJ9 0 14.3 0 0 0 0 0 0 0 42.9 0 0 0 14.3 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
MzJ0 0 22.2 0 0 0 0 0 0 0 44.4 0 0 0 11.1 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
MzM1 0 25 0 0 25 0 0 0 0 0 0 0 50 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
MzM2 0 33.3 0 0 0 0 33.3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 33.3 0 0 0 0 2
MzM3 16.6 16.6 16.6 0 0 0 0 0 16.6 0 0 0 0 16.6 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
MzM4 0 20 0 0 0 0 0 0 40 0 0 0 0 40 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
MzM5 16.6 16.6 0 0 0 0 16.6 0 0 0 0 0 0 33.2 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
MzM6 0 16.6 16.6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 16.6 0 0 0
0 0 0 0 0 16.6 16.6 0 0 2
MzM7 20 0 0 0 0 0 20 0 40 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
MzM8 20 40 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 20 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
MzM9 0 14.3 14.3 0 0 0 14.3 0 0 0 0 0 14.3 14.3 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
MzM0 25 25 0 25 0 0 0 25 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 2
MzS1 0 0 0 0 0 20 0 0 0 20 0 0 20 20 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
MzS2 0 0 14.3 0 0 0 0 0 14.3 0 0 0 28.6 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
MzS3 0 50 0 0 0 0 0 0 0 0 0 12.5 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
MzS4 0 12.5 12.5 0 0 0 0 0 0 0 0 25 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
MzS5 28.6 0 0 14.3 0 0 0 0 0 14.3 42.9 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
MzS6 0 0 0 16.6 0 0 0 16.6 0 0 0 49.8 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
MzS7 0 16.6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
MzS8 0 20 0 20 20 0 0 0 0 0 0 20 0 0 0
0 20 0 0 0 0 0 0 0 3
MzS9 0 11.1 11.1 11.1 0 0 0 0 0 11.1 44.4 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3
MzS0 0 33.3 0 0 0 0 0 0 0 33.3 33.3 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 3

REFERENCIAS DE LA MATRIZ BASICA DE DATOS

	Ejemplo:
X1: variable identificatoria	X1: MyJ1
X2: Pestalotiopsis oxyanthi	X2: 40
X3: Alternaria alternata	X3: 0
X4: Cladosporium cladosporioides	X4: 0
X5: Cladosporium oxysporum	X5: 0
X6: Cladosporium sphaerospermum	X6: 0
X7: Xylohypha curta	X7: 0
X8: Nigrospora oryzae	X8: 0
X9: Fusarium lateritium	X9: 20
X10: Epicoccum purpurascens	X10: 0
X11: Penicillium sp.	X11: 0
X12: Hormonema dematioides	X12: 0
X13: Acremonium strictum	X13: 0
X14: MME5	X14: 0
X15: MDE1	X15: 0
X16: levaduras	X16: 20
X17: Fusarium sulphureum	X17: 0
X18: Leptosphaerulina aff. australis	X18: 0
X19: Microsphaeropsis olivacea	X19: 0
X20: Fusarium oxysporum	X20: 0
X21: Wardomyces aff. inflatus	X21: 0
X22: Eurotium rubrum	X22: 0
X23: Paecilomyces sp.	X23: 0
X24: Drechslera bicolor	X24: 0
X25: Pithomyces chartarum	X25: 0
X26: Scytalidium thermophilum	X26: 0
X27: Phoma pomorum	X27: 0
X28: Chaetomium globosum	X28: 0
X29: Pseudomorfea coffeae	X29: 0
X30: Variable de agrupamiento	X30: 1
My: mayo	
Ag: agosto	
Nv: noviembre	
Mz: marzo	
J: joven	
M: madura	
S: senescente	

primero calculan la matriz de asociación entre variables o individuos y luego aplican el método multivariado a dicha matriz que da el resultado analítico. Los métodos multivariados analizan las relaciones descritas por la matriz de asociación.

Métodos de ordenación: logran una representación de los datos en un espacio de 2 o 3 dimensiones, reteniendo la mayor variación posible. Los métodos de ordenación se basan sobre la idea de que un espacio de p dimensiones puede ser representado en menos dimensiones ya que las p variables están más o menos correlacionadas.

El análisis de componentes principales (PCA) expresa la posición coordinada de n individuos en término de ejes ortogonales. De manera que la variación sobre el eje PC1, se maximiza. PC2 es perpendicular a PC1 y además expresa la máxima variación lineal residual, y así sucesivamente para los ejes siguientes. Los componentes surgen del análisis de la matriz de correlación o covarianza entre variables.

Análisis discriminante: Su objetivo es discriminar 2 o más grupos de individuos y determinar qué variable es mejor discriminante para distinguir los grupos.

Son condiciones para aplicar el análisis discriminante que la distribución de las variables sea normal o razonablemente simétrica, la matriz de covarianza dentro de los grupos debe ser relativamente homogénea y el número de casos debe ser mayor que el de variables.

5.12.1 EN DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ DE LAS HOJAS.

En cada mes de muestreo las comunidades fúngicas de cada tipo de hoja se estudiaron utilizando análisis de componentes principales, ACP (Dixon, 1981, 4M) y análisis discriminante, AD (Dixon, 1981, 7M, stepwise). Siendo la matriz para cada mes de muestreo de 29 variables por 30 casos. En el AD se agregó la variable número 30 de agrupamiento.

5.12.2 EN DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO.

Para estudiar las comunidades fúngicas en las distintas estaciones se aplicó para cada tipo de hoja (y a lo largo del año) ACP y AD. Siendo la matriz para cada tipo de hoja de 29 variables por 40 casos. En el AD se agregó la variable número 30 de agrupamiento.

6 RESULTADOS Y DISCUSION

6.A DISTINTOS SECTORES DE LA HOJA

6.A.1 HUMEDAD DE LAS MUESTRAS.

Determinar el porcentaje de humedad de los tejidos tuvo como objetivo verificar la existencia o no de diferencias de la misma en los distintos sectores de la hoja madura y relacionarlo con los datos obtenidos de longitud de micelio, TCFL y TCF.

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 2, donde cada valor es la media de tres repeticiones y sus desviaciones standard.

El porcentaje de humedad de la hoja es mayor en la base (61,75%) y disminuye hacia el ápice (58,9%); De acuerdo con las características que se encuentran presentes en cada sector. A mayor proporción de parénquima corresponde mayor humedad.

Estos datos se sometieron a un ANOVA de un factor (sector de la hoja) con tres niveles: base, centro, ápice, dando como resultado que las diferencias en el porcentaje de humedad de los distintos sectores eran significativas ($F_{2,6}=45,16$; $P<0,05$).

Se plantearon contrastes de Tukey entre pares de medias para el porcentaje de humedad y se vio que el valor medido en

	BASE	CENTRO	APICE
CARBONO	45.28	46.88	48.11
HIDROGENO	5.04	6.08	6.30
NITROGENO	1.15	1.46	1.28
CENIZAS	2.87	3.1	4.67
C/N	39.4	32.1	37.6
HUMEDAD	61.75±0.41	60.72±0.38	58.91±0.32

TABLA 2: Composición química de distintos sectores de la hoja. Los valores de carbono, hidrógeno, nitrógeno y cenizas están expresados en porcentaje por peso seco de hoja, corresponden a muestras tomadas en el mes de mayo de 1985 y fueron realizadas en la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos en Química Orgánica, CONICET, FCEN, UBA. Los valores de humedad son el promedio de tres repeticiones \pm d y están expresados en porcentaje por peso fresco.

la punta difiere significativamente de los del centro y base.

Se usó el paquete estadístico BIOM (Rolf, 1982).

6.A.2 ANATOMIA FOLIAR

Las hojas están en fascículos de tres hojas, a veces cuatro sobre cada braquiblasto y protegidos en la parte basal por catáfilas que rodean al fascículo (Fig.6). En corte transversal las hojas tienen aproximadamente sección triangular. Dos lados de dicho triángulo, los internos del fascículo corresponden a la cara adaxial de la hoja (Fig.7).

Las acículas maduras describen un arco en el espacio; como resultado de esto la porción media de la hoja recibe mayor radiación. Además, las hojas del pino, aparentemente no presentan dorsiventralidad, que permita que una cara esté más expuesta que la otra a la radiación.

Se ha observado que la cara abaxial es brillante y lisa al tacto mientras que la superficie adaxial es opaca y áspera. Esto último podría estar determinado por la presencia de prolongaciones papilosas de las células epidérmicas que se han observado con MEB y se mencionan en 6.A.4

En ambas caras de la hoja se observan hileras de estomas (típicos del género). El sector basal protegido por las catáfilas y una porción muy reducida y terminal del ápice de la hoja carecen de ellos.

Las células epidérmicas tienen la pared muy engrosada y el

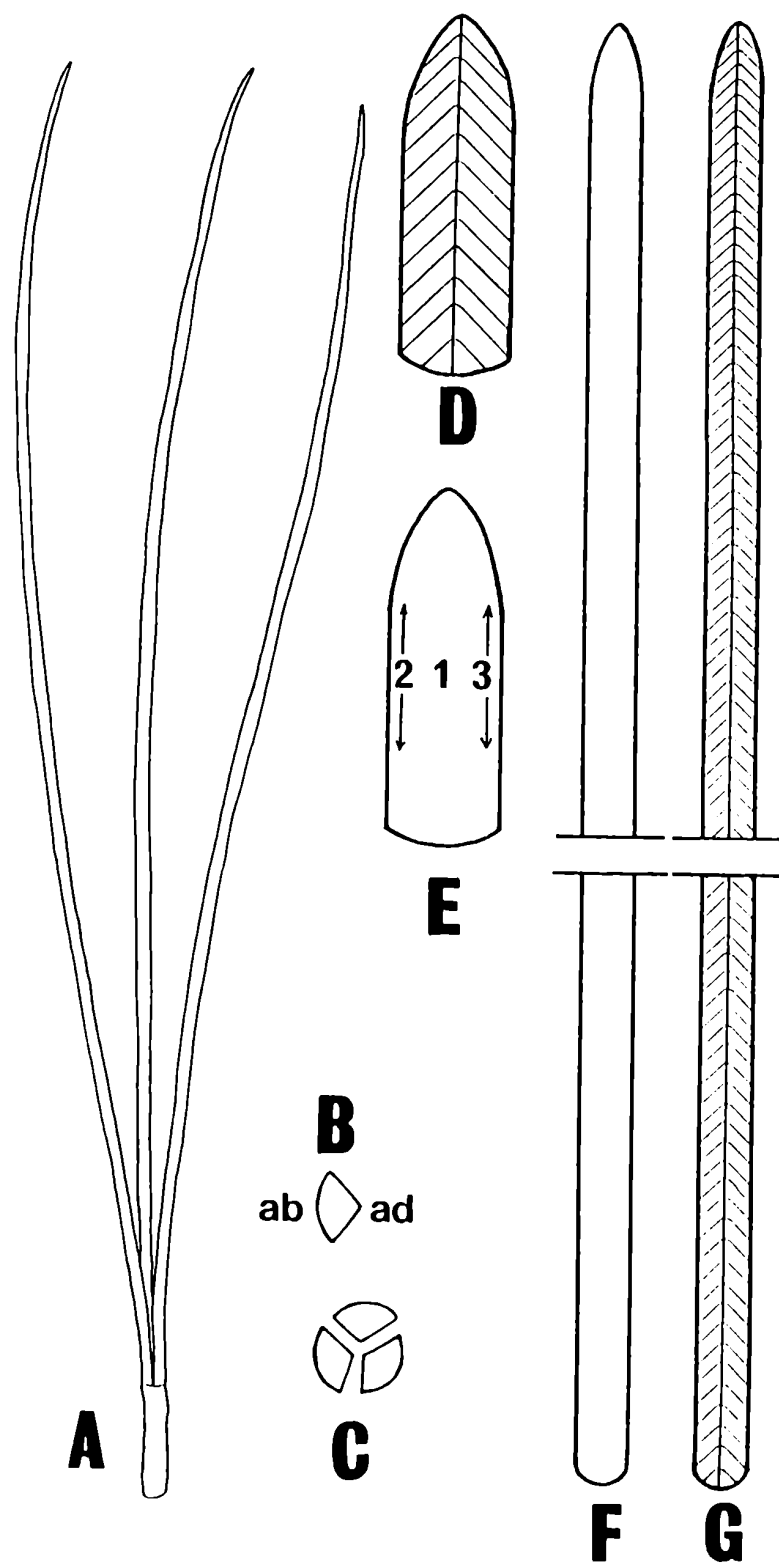
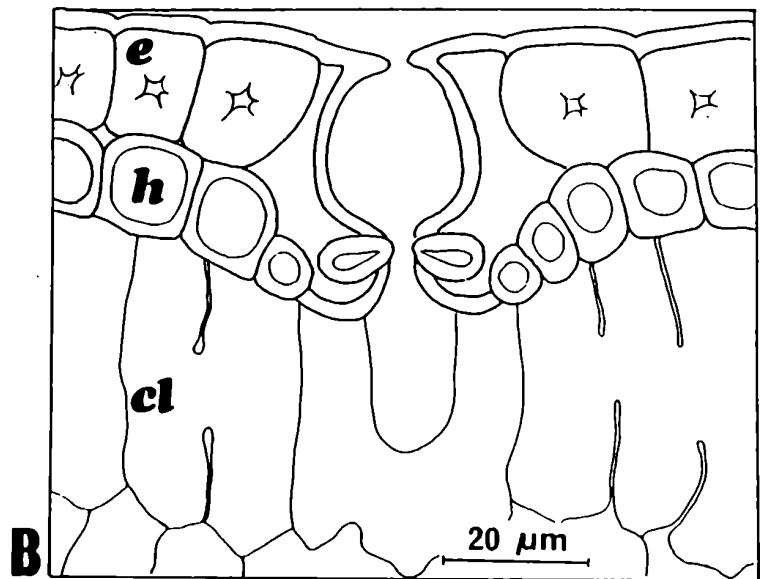
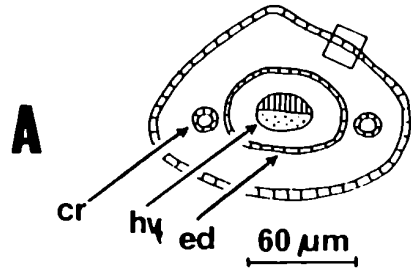


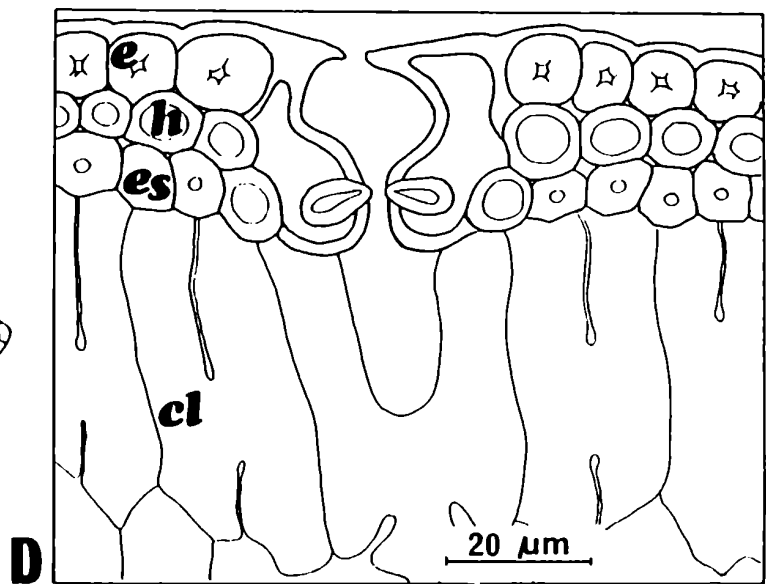
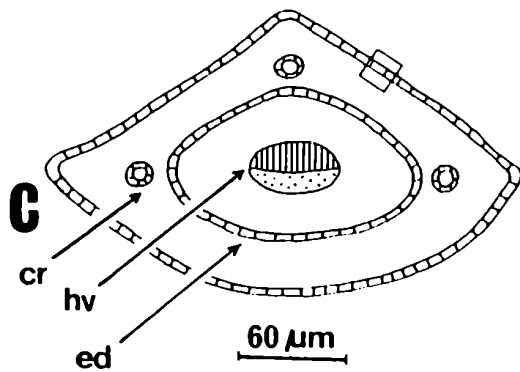
FIGURA 6: A-G. A: fascículo de hojas aciculares con catáfilas en su base; B: corte transversal de una acicula; C: corte transversal en la parte basal del fascículo; D: ápice en vista adaxial; E: ápice abaxial; F: acicula en vista abaxial; G: acicula en vista adaxial. ad: adaxial; ab: abaxial; 2 y 3 margen; 1 centro.

FIGURA 7 : A-F Cortes transversales en diferentes sectores de la hoja de *Pinus taeda*. A, C, y E: esquemas a nivel de los sectores apical, central y basal respectivamente; B, D y F: detalle de los tejidos externos a nivel de los sectores apical, central y basal respectivamente. Los detalles B, D y F corresponden a zonas recuadradas en A, C y E respectivamente. e: epidermis; h: hipodermis; cl: clorénquima; es: esclerénquima; p: parénquima; hv: haz vascular; cs: canal resinífero; ed: endodermis.

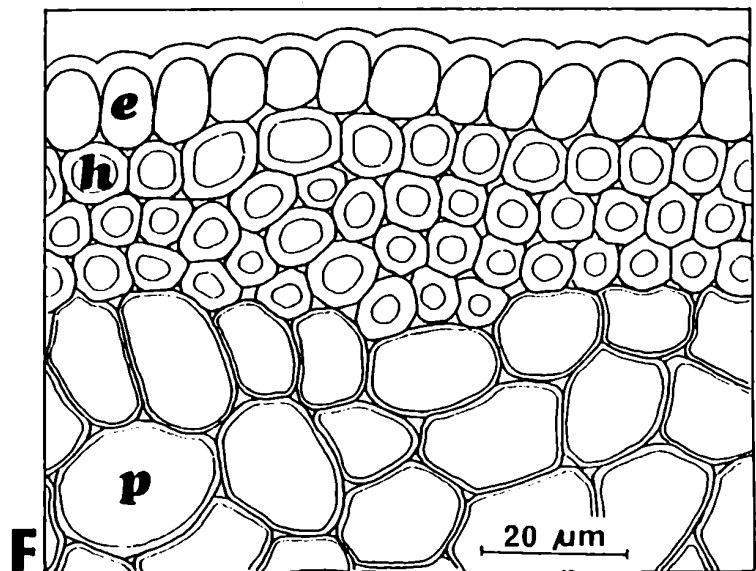
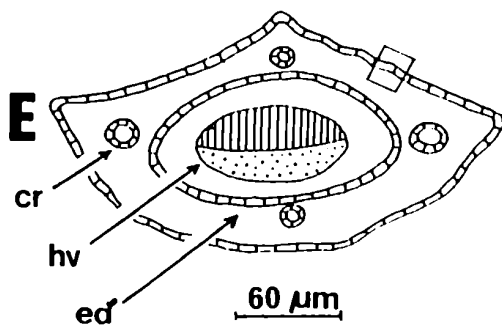
APICE



CENTRO



BASE



lumen pequeño, tanto en la zona apical de la hoja como en la central, mientras que en la basal la pared es más delgada. Leyton y Juniper (1963) mencionaron en *Pinus sylvestris* la presencia de dos capas de ceras más delgadas en la zona basal de la hoja que en el resto de la acícula y que esa sería una zona por la que posiblemente se transfieran solutos.

Por debajo de la epidermis se observa una capa de hipodermis tanto en el ápice como en el centro de la hoja y varias capas (3-4) en la base.

Unicamente en la parte central de la acícula se observa esclerenquima por debajo de la hipodermis (Fig.7D). El tejido clorenquimático sigue a estas capas más externas en la zona apical y central, mientras que en la basal, bajo la hipodermis se encuentra el parénquima. Internamente hay un sólo haz vascular que se extiende a lo largo de toda la hoja. En la base se observan 4 canales resiníferos de los que sólo 2 llegan hasta el ápice de la hoja (Fig.7E,C,A).

6.A.3 DETERMINACIONES QUIMICAS

Los resultados de las determinaciones de C, N, H y cenizas en los distintos sectores de la hoja figuran en la Tabla 2. Los valores están expresados en porcentaje por peso seco de hoja. En la misma tabla se incluyeron los valores de la relación C/N.

En la Fig.8 se puede observar la relación de la longitud

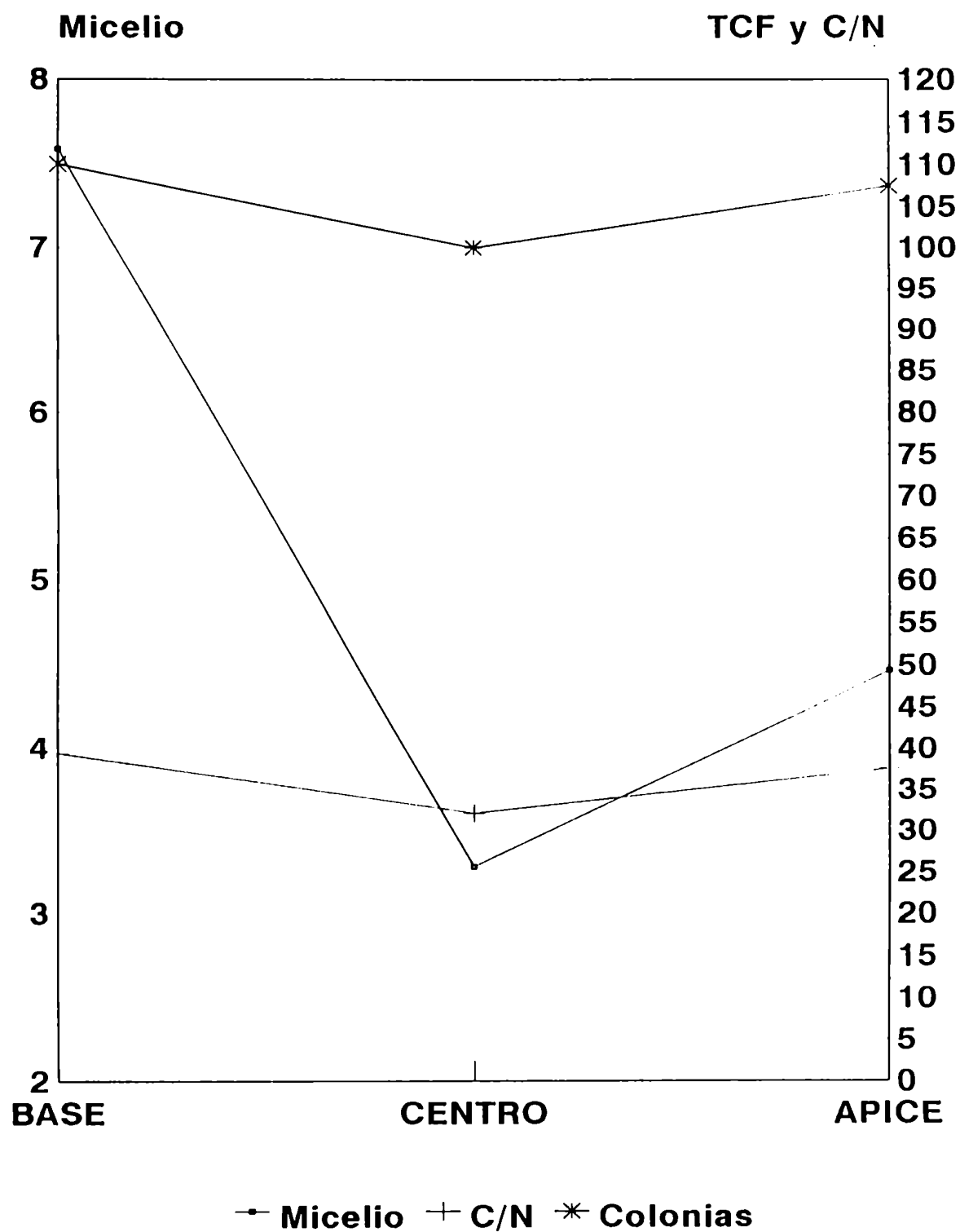


FIGURA. 8.: Longitud de micelio (m/g de peso seco de hoja), número de colonias filamentosas (TCF) y relación C/N en los distintos sectores de la hoja madura de *Pinus taeda*

de micelio y la frecuencia de colonias en los distintos sectores de la hoja con el coeficiente C/N. Se observa que existe una relación directa entre los mismos.

6.A.4 OBSERVACIONES CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

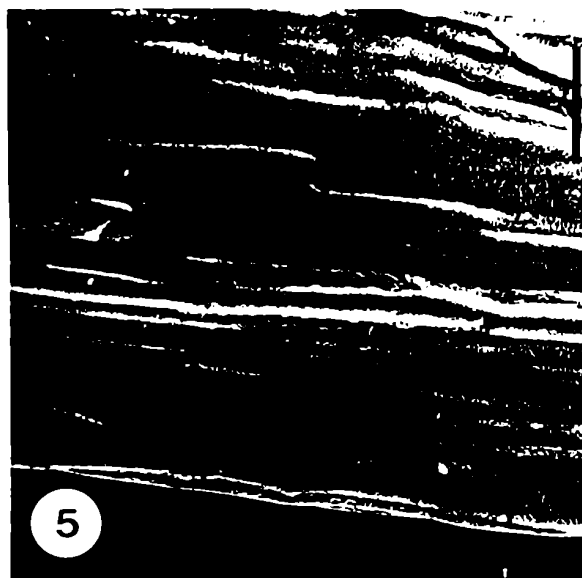
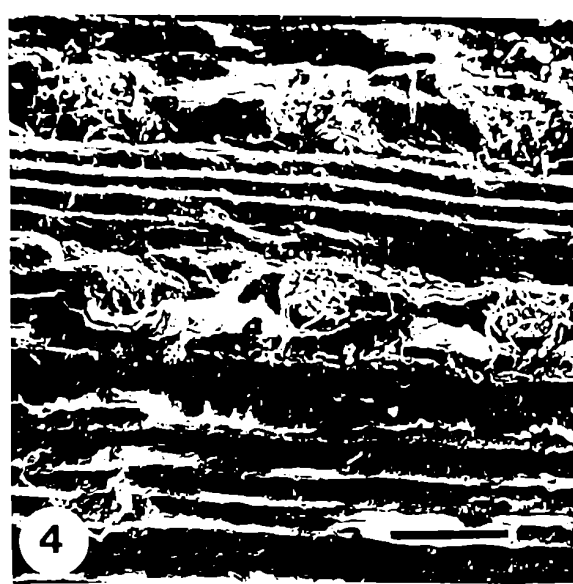
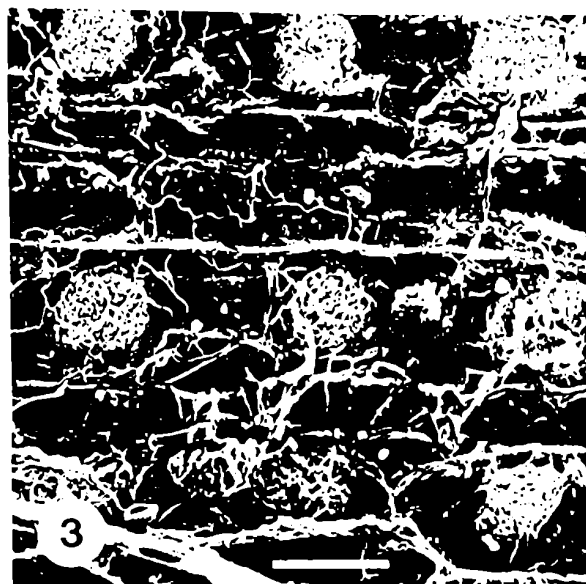
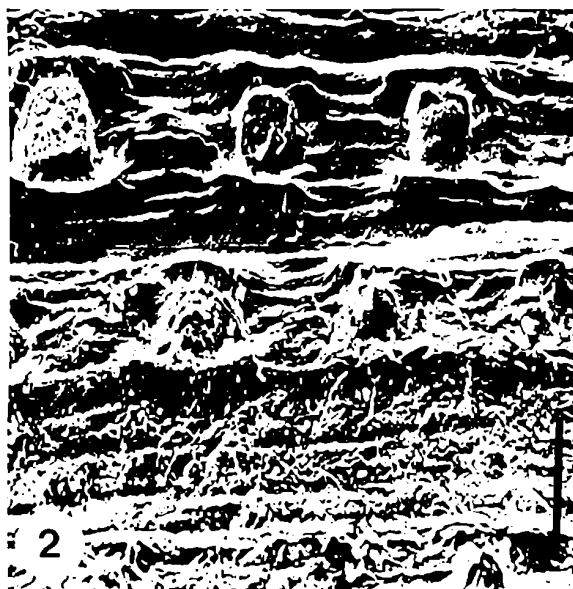
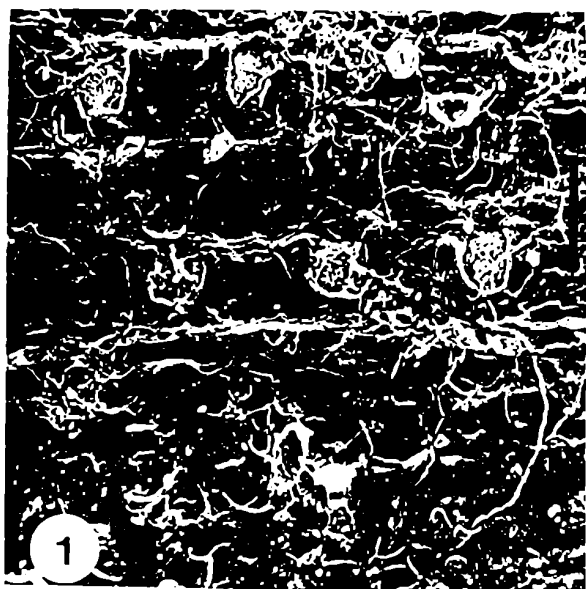
A través de las observaciones realizadas con MEB del filoplano de la hoja se ve que los hongos en las acículas de *Pinus taeda* se distribuyen en estrecha relación con las características topográficas de cada sector, coincidiendo esto con los resultados obtenidos por Menna (1959) en pasturas, Pugh y Buckley (1971) en *Acer pseudoplatanus* y por Bernstein y Carroll (1977) en *Pseudotsuga menziesii*.

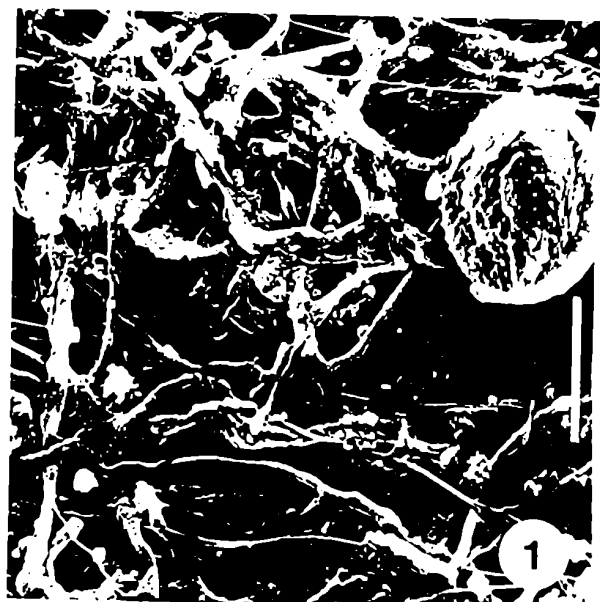
Las células epidérmicas de la cara adaxial presentan prolongaciones papilosas y los canales entre células posiblemente sean más profundos, esto sería favorable para la deposición, crecimiento y anclaje de las hifas.

El patrón de colonización que se observó es el siguiente: en el sector apical (Lámina 1A y 1B) los hongos colonizan toda la superficie menos la parte central de la cara abaxial.

En el centro de la hoja, la cara adaxial (Lámina 1A,3), de textura áspera, se halla más colonizada que la cara abaxial (Lámina 1A,4), más lisa, en la que se observa micelio sólo relacionado con los estomas. Estos proporcionan un microhabitat favorable, protegiendo a los microorganismos de la luz, la desecación y los insectos y aumentando la humedad y la cantidad de nutrientes disponibles.

LAMINA A1: Fotografías con microscopía electrónica de barrido de las superficies adaxial y abaxial de la hoja de *Pinus taeda*. **Fig. 1:** sector apical, cara adaxial; **Fig. 2:** sector apical, cara abaxial; **Fig. 3:** sector central, cara adaxial; **Fig. 4:** sector central, cara abaxial; **Fig. 5:** sector basal, cara adaxial; **Fig. 6:** sector basal, cara abaxial. En todas las fotografías la parte inferior de las mismas corresponde al margen de las acículas. Escala: 40 μm .





LAMINA A2: Detalle con mayor aumento de las figuras 1-4 de la Lámina A1; Fig.1: sector apical, cara adaxial; Fig.2: sector apical, cara abaxial; Fig.3: sector central, cara adaxial; Fig.4: sector central, cara abaxial. Las Figs. 2, 3 y 4 corresponden a zonas estomáticas. Escala: 10 μ m.

La parte basal de la hoja no tiene estomas y carece de micelio superficial (Lámina 1A,5 y 1A,6) a pesar de que las catáfilas protegen esa zona de la desecación y la radiación. Los resultados obtenidos en 6.A.5 y 6.A.6 permiten suponer que la base de la hoja está colonizada sólo por organismos endofitos.

Esto coincide con lo encontrado por otros autores que observaron, en otros géneros, que los saprófitos foliares se distribuyen en depresiones situadas en las paredes de las células epidérmicas y dispuestos perpendicularmente a la cutícula (Menna, 1959; Ruinen, 1961). El crecimiento hifal en la superficie foliar para muchos hongos está determinada por las características topográficas de la superficie. Estas proveerían las señales para un crecimiento orientado (Allen et al., 1992).

Pugh y Buckley (1971) observaron *Sporobolomyces* sp. y *Aureobasidium* sp. a lo largo de la vena media en la cara superior de *Acer pseudoplatanus*. Estudios posteriores realizados por Bernstein y Carroll (1977) determinaron también que la población de microorganismos de las acículas de *Pseudotsuga menziesii* se encuentra distribuida a lo largo de la depresión de la vena media, en la cara adaxial y en las cavidades estomáticas y los canales que existen entre las hileras de células epidérmicas abaxiales. Las depresiones protegerían de los elementos físicos tales como luz solar y desecación y biológicos como insectos. Además podrían ser reservorios de humedad y de nutrientes lixiviados por la

lluvia. La cobertura microbiana fue mayor en la cara abaxial y aumentó con la edad de manera más notoria en esa cara de *P. menziesii*.

6.A.5 LONGITUD DE MICELIO

Como ya se enunció en 5.10 y 5.10.1 el objetivo de la medición de micelio es lograr una estimación cuantitativa de la cantidad del mismo presente sobre y dentro de los tejidos de la hoja.

En la Fig.8 se han graficado los valores obtenidos expresados en metros de micelio por gramo de peso seco de hoja para los distintos sectores. El método aplicado de Jones y Mollison (1948) y las modificaciones de Thomas et al. (1965), Visser y Parkinson (1975) y Domsch et al. (1979), estima el micelio total, sea éste activo o no.

Se obtiene el mayor valor en la base de la hoja ($7,59 \pm 0,78$ m/gr), decrece en el centro ($3,28 \pm 0,48$ m/gr) y aumenta en el ápice ($4,47 \pm 0,54$ m/gr).

Estos datos se sometieron a un ANOVA de un factor (sector de la hoja), con tres niveles (base, centro, ápice), obteniéndose que no existen estadísticamente diferencias significativas en los distintos sectores de la hoja en cuanto a la cantidad de micelio ($F_{2,6}=3,17$; $P>0,05$).

Los valores de longitud de micelio en los distintos sectores de la hoja guardan una relación directa con el total

de colonias filamentosas, (TCF) y no están relacionados con el porcentaje de humedad de los tejidos. La técnica de micelio cuantifica tanto el endofilo como el superficial y para los hongos del filoplano es más importante la humedad de la superficie foliar y/o la humedad atmosférica que la de los tejidos. La humedad de la superficie posiblemente sea mayor en la base debido a la protección de las catáfilas, seguido por el ápice; la zona central, al recibir más radiación será la de menor humedad superficial. Se puede especular entonces que la distribución del micelio y del número de colonias está relacionada con la humedad de la superficie de la hoja (por lo menos en el centro y ápice, ya que por MEB en la base no se observó micelio y este sector estaría colonizado por endofitos).

Al analizar la cantidad de micelio en relación a las características anatómicas de la hoja: posiblemente los estomas sean las vías de más fácil acceso a la hoja y luego la base sería una zona propicia para el desarrollo miceliano endógeno (mayores valores) por tener células de paredes delgadas y más humedad. Los valores mayores en el ápice con respecto al centro podrían ser explicados por la mayor radiación que recibe en este lugar la hoja o por la presencia de algún factor de crecimiento que promueva la colonización del ápice.

6.A.6 ANALISIS DE LAS POBLACIONES FUNGICAS

El análisis de las poblaciones fúngicas de los diferentes sectores de las hojas tuvo como objetivo demostrar las posibles diferencias en la composición de las comunidades y en el grado de colonización en cada sector (base, centro, ápice). Los resultados obtenidos principalmente TCF se comparan con los de longitud de micelio, porcentaje de humedad, observaciones con MEB, composición química y anatomía foliar para cada sector de la hoja.

En la Tabla 3 figuran los resultados de frecuencia para cada especie correspondiente a cada sector de la hoja obtenidos por el método de lavado de hojas de Williams et al. (1965).

Mediante esta técnica se aislaron los organismos que se encuentran en estado vegetativo en la filosfera, o sea tanto los endofitos como los del filo plano. Aunque se favorece a los del filo plano ya que crecen más.

En su mayoría pudieron ser identificadas taxonómicamente hasta especie. En el grupo de las levaduras se incluyen todas las especies aisladas. Con la sigla IND se denominan las cepas que a pesar de ser fértiles (o haberlo sido en un inicio y luego esterilizarse) no pudieron ser identificadas pero se las caracterizó citando algunas particularidades del cultivo, Tabla 4.

Con las siglas MME (micelio moniliáceo estéril) y MDE

ESPECIES	BASE	CENTRO	APICE
<i>Pestalotiopsis oxyanthi</i>	5	10	7.5
<i>Alternaria alternata</i>	10	12.5	12.5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	32.5	20	22.5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5	10	
<i>Cladosporium oxysporum</i>	5		2.5
<i>Xylohypha curta</i>	7.5	2.5	7.5
<i>Nigrospora oryzae</i>		5	5
<i>Epicoccum purpurascens</i>	7.5	2.5	5
<i>Fusarium oxysporum</i>		2.5	2.5
<i>Fusarium lateritium</i>		2.5	
<i>Fusarium heterosporum</i>			2.5
<i>Fusarium semitectum</i>			2.5
<i>Fusarium sp.</i>	15		
<i>Leptosphaerulina aff. australis</i>	2.5		2.5
<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	2.5		
<i>Pithomyces chartarum</i>	2.5		
<i>Wardomyces aff. inflatus</i>		2.5	
<i>Penicillium sp.</i>		5	2.5
<i>Microsphaeropsis olivaceae</i>		2.5	
<i>Eurotium rubrum</i>		2.5	
<i>Paecilomyces sp.</i>		2.5	
<i>Dreschlera dematioidea</i>			2.5
IND 29		2.5	
IND 27		2.5	
IND 143			2.5
IND 110			2.5
MME 5		2.5	
MME 7		2.5	
Levaduras	15	10	20
NA	15	7.5	25
TCF	110	100	107.5
TCFL	125	110	127.5

TABLA 3: Frecuencia (%) de las especies fúngicas, aisladas por el método de lavado, de la filosfera de *Pinus taeda* en diferentes sectores (base, centro y ápice) de la hoja madura.

	CARACTERIZACION DE LAS CEPAS IND
IND 4	En ME alcanza 7,5 cm en 13 días, colonia de aspecto mucilaginoso sin micelio aéreo. Fiálides aisladas, conspicuas, hialinas, conidios oliváceos. Producción de mucílago.
IND 24	Picnidio con conidios hialinos unicelulares.
IND 27	Peritecio, esporas tabicadas, tricelulares.
IND 29	Picnidio con conidios 0–1 tabicados, castaño oscuros a la madurez (8,8–14,9M) X (3,5–4,4).
IND 71	En ME forma un estroma costroso oscuro, picnidios con conidios hialinos.
IND 110	En ME forma un estroma costroso oscuro, con setas tabicadas, de color castaño oscuro. Célula conidiógena fialídica, pigmentada, conidios color castaño.
IND 143	La colonia crece 5,5 cm en 11 días, micelio blanco. Célula conidiógena fialídica. Conidios (11,02–4,2M) X (2,9–4,6M) Esporádicamente se ven pinceles tipo <i>Penicillium</i> .
IND 268	La colonia crece 2,3 cm en 5 días, forma estroma costroso negro sobre la superficie del agar y micelio aéreo blanco. Reverso marmoleado, con parches blancos y negros. Rizomorfos en tubo de ensayo.
IND 442	Colonia gris a castaño, de textura afelpada. Conidios bicelulares gutulados, de pared ornamentada, espinosa.

TABLA 4: Caracterización de las cepas indeterminadas. Se consideraron las características morfológicas más notables de cada cultivo

(micelio dematiáceo estéril) se denominaron las cepas estériles inicialmente y que no se logró hacer fructificar por ninguno de los medios de cultivo y/o ensayos citados en 5.9.2, materiales y métodos, (pág.142). NA designa a las cepas que no pudieron ser aisladas, pero sí contadas. Estas crecían lentamente sobre las partículas de hojas junto con otras colonias que las superaban en velocidad. En este mismo grupo se incluyeron las cepas que se perdieron, principalmente por contaminación. De 40 partículas de hoja sembrados para cada sector (pág.140) se aislaron 125 colonias TCFL (total de colonias filamentosas y levaduras) para la parte basal de la hoja, de las cuales, 110 colonias corresponden a hongos filamentosos TCF (total de colonias filamentosas) y 15 a levaduras. En el centro de la hoja el número de colonias TCFL es de 110, siendo 100 hongos filamentosos TCF y 10 levaduras. En el ápice el número de TCFL resultó 127,5, de los cuales 107,5 corresponden a hongos filamentosos TCF y 20 a levaduras.

En algunos casos de cada trozo se aisló más de una cepa; esto explica los valores mayores que 100 y los números decimales.

El total de colonias tanto TCFL como TCF presentan valores menores en el centro de la hoja, esto podría deberse a que, este sector de la hoja madura es el que, consideramos, recibe mayor irradiación por su disposición espacial.

Las especies con mayores frecuencias para todos los sectores de la hoja fueron *Cladosporium cladosporioides*,

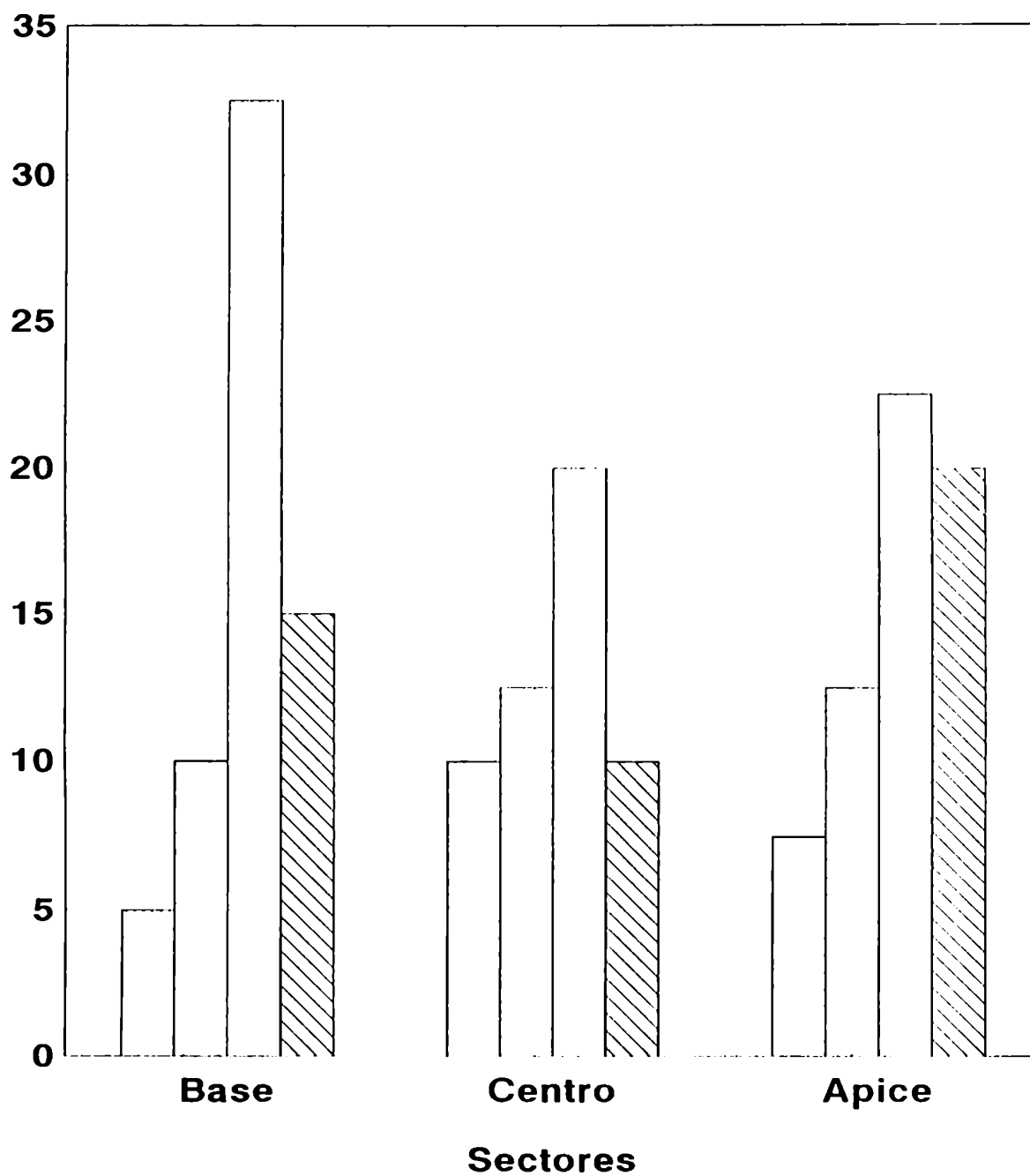
Alternaria alternata, *Pestalotiopsis oxanthi* y el grupo de las levaduras (Fig.9), seguidos por *Xylohypha curta* y *Epicoccum purpurascens*. *Cladosporium sphaerospermum*, *C. oxysporum*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. Este último se encuentra sólo en la base y con una frecuencia importante (15). Las restantes especies se aislaron en frecuencias menores de 5%.

De los distintos sectores de la hoja se aislaron 28 especies diferentes de hongos filamentosos, encontrándose la menor variabilidad de especies en el sector basal donde se aislaron 11 especies diferentes, mientras que en sector central y apical fueron 18 y 15 especies respectivamente, (Fig.10).

Fusarium sp. tiene frecuencia alta en el sector basal. Este grupo típico de suelo, posiblemente se ve favorecido por las condiciones de mayor humedad de los tejidos y protección dada por las catáfilas que protegen la base de las acículas.

En la Tabla 5 se discrimina el porcentaje de especies Moniliáceas y Dematiáceas tanto sobre el total de cepas aisladas TCFL, como sobre los hongos filamentosos exclusivamente TCF, para cada sector de la hoja. Se observa un predominio de las especies Dematiáceas en todos los sectores de la hoja; tanto sobre TCFL como sobre TCF. Las especies Moniliáceas, por carecer de pigmentos oscuros, de acuerdo a lo encontrado por Ruscoe (1971) en *Nothofagus* sp. y otros autores, se esperaba que estuvieran presentes menos frecuentemente en las zonas que soportan mayor irradiación

Frecuencia



☐ P.oxyanthi
 ☐ A.alternata
 ☐ C.cladosporioides
 ☒ Levaduras

FIGURA 9: Frecuencia (%) de las especies fúngicas más importantes presentes en la filosfera de los distintos sectores de la hoja madura de *Pinus taeda* aisladas por el método de lavado.

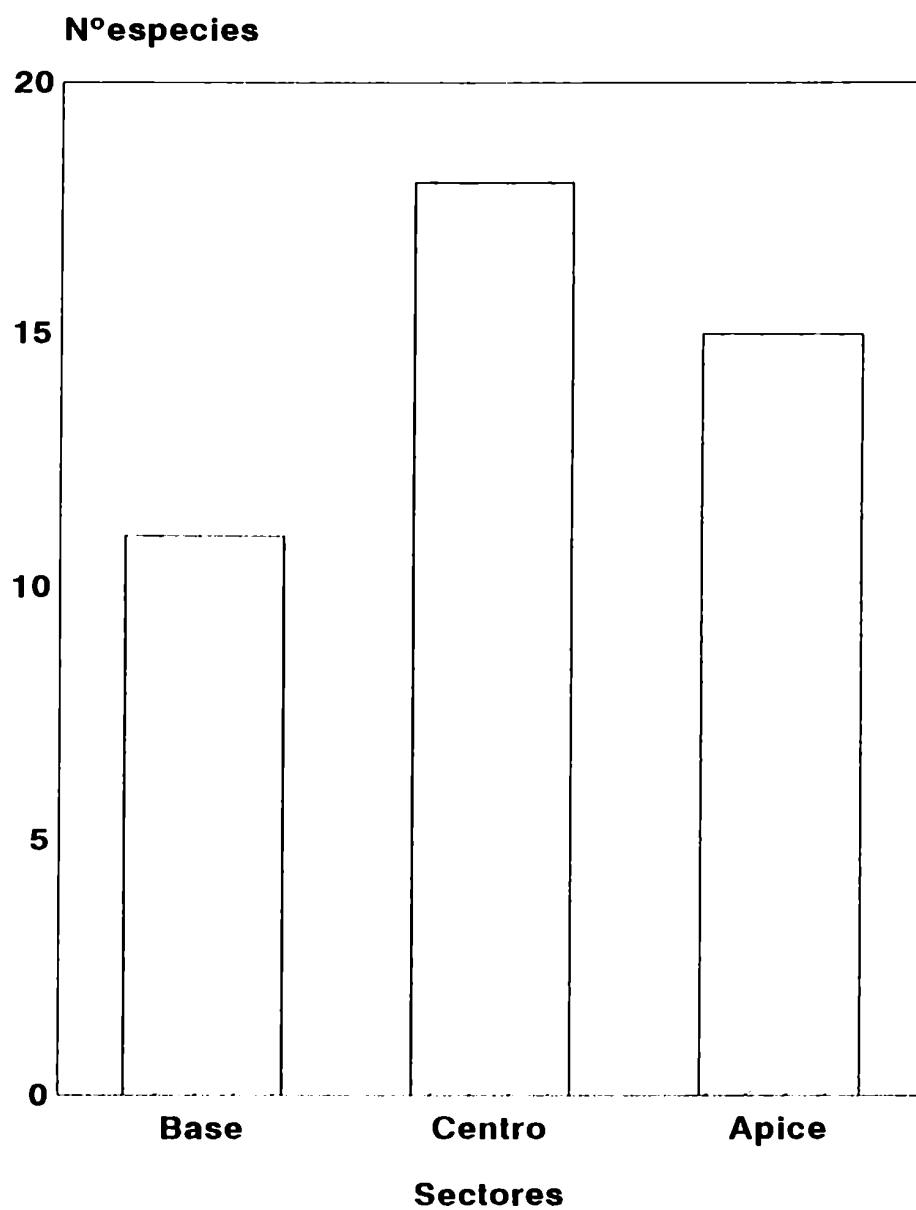


FIGURA 10: Diversidad específica (número de especies) en los diferentes sectores (base, centro y ápice) de la hoja madura de *Pinus taeda*.

		MAYO		
		Base	Centro	Apice
TCFL	Especies Dematiáceas	72.7	70.7	68.3
	Especies Moniliáceas	27.3	29.3	31.7
TCF	Especies Dematiáceas	84.2	78.4	84.9
	Especies Moniliáceas	15.8	21.6	15.1

TABLA 5: Porcentaje de especies moniliáceas y dematiáceas en cada uno de los sectores de la hoja madura sobre TCFL (colonias filamentosas y levaduras) y sobre TCF (colonias filamentosas).

liv, o sea en el ápice y en el centro de la hoja. La zona basal resultaría la más propicia para ellos. Los resultados obtenidos no concuerdan con esta hipótesis ya que en el sector apical el porcentaje de especies Moniliáceas 15,1 es semejante al basal 15,8 en TCF e incluso es mayor 31,7 en el ápice en relación a 27,3 en la base para TCFL. Dickinson (1976) menciona varios hongos epífitos, con paredes celulares hialinas como las levaduras y los "mildews" pulverulentos que se desarrollan con éxito en ese habitat. Sugiere que el efecto adverso de la radiación sobre los hongos epífitos debe ser reconsiderado.

6 RESULTADOS Y DISCUSION

6.B DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ DE LA HOJA Y DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO

6.B.1 HUMEDAD DE LAS MUESTRAS.

Determinar el porcentaje de humedad de los tejidos en los diferentes estadios de la hoja y en las distintas estaciones del año tuvo como objetivo determinar la existencia o no de diferencias en este parámetro en relación a estadios y/o estaciones y comparar con los datos obtenidos en las mediciones de longitud de micelio, diámetro hifal, biomasa fúngica, TCFL y TCF.

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 6 siendo cada valor la media de tres repeticiones con su desviación standard.

Se observa que en todas las estaciones del año el porcentaje de humedad de las hojas disminuye con la edad de las mismas.

En el mes de marzo se obtienen los mayores porcentajes de humedad y los mínimos en noviembre, con excepción de la hoja joven (En noviembre tienen tres meses de edad y por lo tanto los tejidos no están completamente diferenciados).

El mayor porcentaje de humedad de los tejidos se obtiene en marzo, luego de transcurrir dos meses del máximo de precipitaciones en enero; el mínimo de precipitaciones en

	MAYO	AGOSTO	NOVIEMBRE	MARZO
JOVEN	63.49 \pm 0.70	62.55 \pm 0.74	65.14 \pm 0.39	67.58 \pm 0.77
MADURA	60.72 \pm 0.38	58.24 \pm 0.33	56.89 \pm 0.35	63.63 \pm 1.3
SEÑIL	57.51 \pm 0.24	53.76 \pm 0.34	53.21 \pm 1.89	60.4 \pm 0.84

TABLA 6: Humedad de los tejidos de la hoja en los distintos estadios de madurez y en las estaciones. Cada valor es la media de tres repeticiones del porcentaje de humedad \pm d.

septiembre es seguido por mínimo de humedad en los tejidos en noviembre. De acuerdo a esto habría una relación directa con un defasaje de dos meses entre la humedad de los tejidos y las precipitaciones.

A estos resultados se aplicó un ANOVA de dos factores (meses del año vs. estados de madurez) y se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles de cada factor y en la interacción de dichos factores ($F(\text{madurez})_{2,24}=310,72$; $F(\text{meses})_{3,24}=89,74$; $F(\text{inter.})_{6,24}=9,07$, $P<0,05$).

Al hacer pruebas de efecto simple para humedad se obtuvo que tanto la hoja joven como la madura y la senescente tienen diferencias significativas en relación a las estaciones del año. Además en todas las estaciones muestreadas (mayo, agosto, noviembre y marzo) hay diferencias significativas entre los estadios.

Al hacer contrastes según Tukey se observó que agosto y noviembre no son estadísticamente diferentes ($P<0,05$) en porcentaje de humedad.

6.B.2 DETERMINACIONES QUIMICAS

Los resultados de las determinaciones químicas figuran en la Tabla 7. Los valores de Carbono, Nitrógeno, Hidrógeno y cenizas están expresados en porcentaje por peso seco de hoja. Se incluyen en la misma tabla los valores de la relación C/N.

Teniendo en cuenta que en el mes de agosto la yema apical de cada rama retoma el crecimiento produciendo nuevas hojas;

	MAYO	AGOSTO	DICIEMBRE	MARZO
JOVEN	C: 47.81	C: 46.86	C: 46.79	C: 47.97
	H: 6.57	H: 6.42	H: 6.28	H: 6.46
	N: 1.21	N: 1.38	N: 1.29	N: 1.34
	Cz: 1.9	Cz: 3.62	Cz: 2.39	Cz: 3.63
MADURA	C: 46.88	C: 47.52	C: 47.15	C: 47.65
	H: 6.08	H: 6.68	H: 6.29	H: 6.50
	N: 1.46	N: 1.47	N: 1.18	N: 1.32
	Cz: 3.1	Cz: 1.97	Cz: 3.86	Cz: 3.83
SENIL	C: 46.14	C: 47.80	C: 47.29	C: 47.12
	H: 6.3	H: 6.5	H: 6.29	H: 6.39
	N: 0.83	N: 1.56	N: 1.16	N: 1.24
	Cz: 5.08	Cz: 3.4	Cz: 3.69	Cz: 3.68

TABLA 7: Composición química de la hoja en distintos estados de madurez y en las estaciones del año. Los valores de carbono, hidrógeno, nitrógeno y cenizas están expresados en porcentaje por peso seco de hoja, corresponden a muestras tomadas desde el mes de mayo de 1985 a marzo de 1986 y fueron realizadas en la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos en Química Orgánica, CONICET, FCEN, UBA.

las muestras de hojas jóvenes tomadas en el censo siguiente (noviembre) son las más jóvenes.

En la Fig.11 se puede observar la relación de la biomasa fúngica con el cociente C/N. En la misma se han representado dichos valores desde la hoja más joven (noviembre) hasta la hoja más senescente (agosto). Los estadios progresivos de madurez han sido numerados desde 1 a 12.

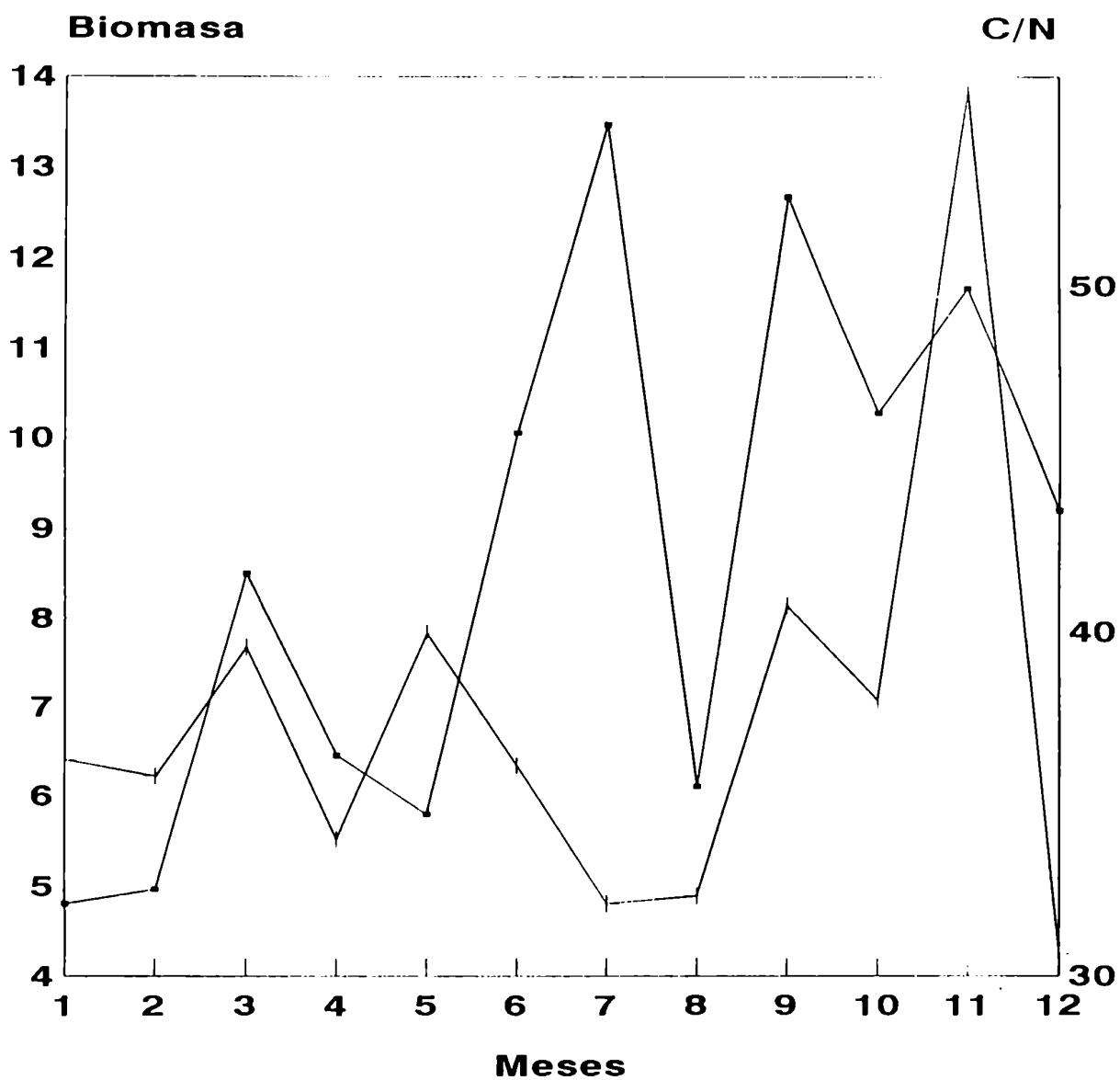
Se observa una relación directa entre la biomasa fúngica y la relación C/N en los primeros estadios de colonización (hoja joven) y también en los últimos (hoja senescente). En los estados progresivos de la hoja madura no se observa relación con C/N.

6.B.3 OBSERVACIONES CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

Se utilizó esta técnica para conocer la distribución superficial del micelio en ambas caras de las hojas de *P. taeda*.

Las observaciones de la superficie de hojas en distintos estados de madurez y en las cuatro estaciones realizadas con Microscopía Electrónica de Barrido figuran en las Láminas 1 a 8.

En el mes de mayo (Lámina 1) se observa un aumento de la cantidad de micelio superficial desde la hoja joven a la senescente. Además en esta última la colonización de la cara adaxial es mayor que la abaxial. La Lámina 2 muestra detalles con mayor aumento (2400x). En todas las figuras de esta

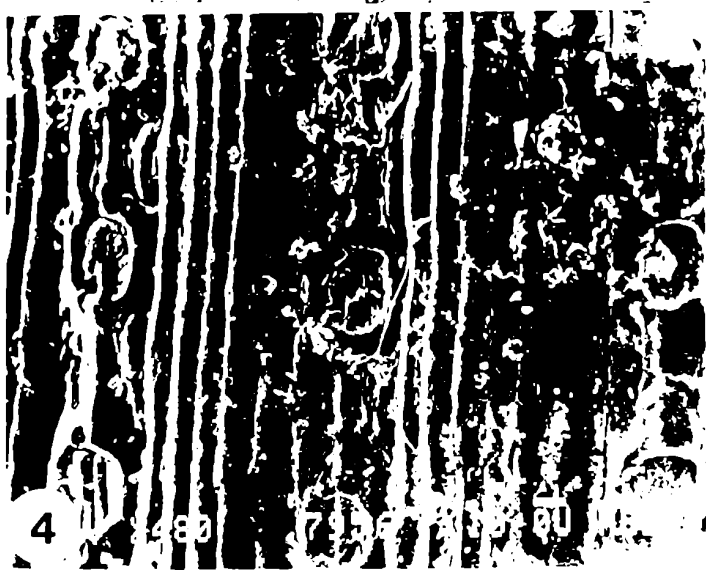


•• Biomasa +- C/N

FIGURA 11: Biomasa miceliana en mg x 10³/g de peso seco de hoja y relación C/N en la secuencia de colonización. (X=1,2,3,4 corresponden a hoja joven; X=5,6,7,8 corresponden a hoja madura; X=9,10,11,12 corresponden a hoja senescente)

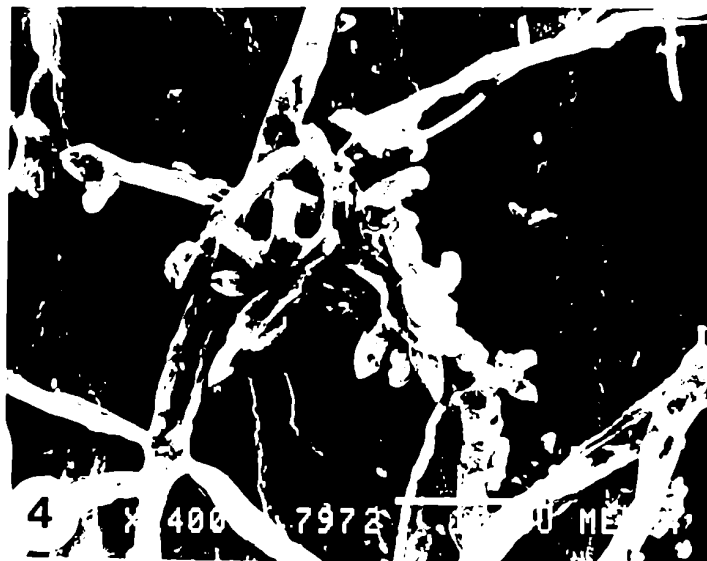
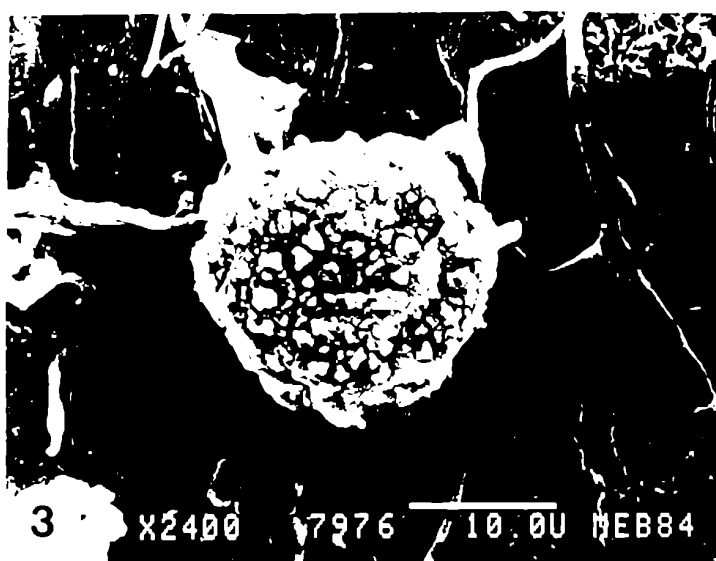
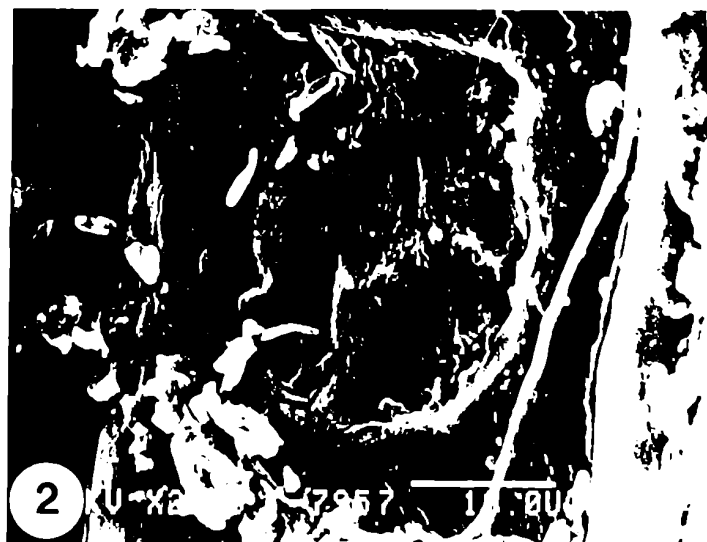
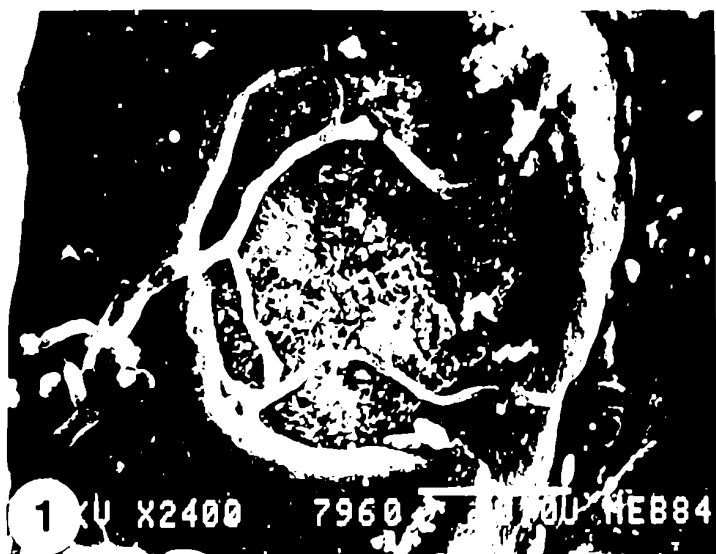
LAMINA 1: Fotografías con microscopía electrónica de barrido de las superficies adaxial y abaxial de la hoja de *Pinus taeda*. correspondientes al mes de mayo **Fig.1:** hoja joven, cara adaxial; **Fig.2:** hoja joven, cara abaxial; **Fig.3:** hoja madura, cara adaxial; **Fig.4:** hoja madura, cara abaxial; **Fig.5:** hoja senescente, cara adaxial; **Fig.6:** hoja senescente, cara abaxial.

LAMINA 1



LAMINA 2: Fotografías con microscopía electrónica de barrido de las superficies adaxial y abaxial de la hoja de *Pinus taeda*. correspondientes al mes de mayo **Fig.1:** hoja madura, cara adaxial; **Fig.2:** hoja madura, cara abaxial; **Fig.3:** hoja senescente, cara adaxial; **Fig.4:** hoja senescente, cara abaxial; **Fig.5:** hoja senescente, cara adaxial; **Fig.6:** hoja senescente, cara abaxial.

LAMINA 2



LAMINA 3: Fotografías con microscopía electrónica de barrido de las superficies adaxial y abaxial de la hoja de *Pinus taeda*, correspondientes al mes de agosto **Fig.1:** hoja joven, cara adaxial; **Fig.2:** hoja joven, cara abaxial; **Fig.3:** hoja madura, cara adaxial; **Fig.4:** hoja madura, cara abaxial; **Fig.5:** hoja senescente, cara adaxial; **Fig.6:** hoja senescente, cara abaxial.

LAMINA 3



lámina se observan hifas y abundantes conidios ovalados y bacilares. En la Fig.3 se observa un conidio de *Epicoccum* sp. En las Figs.5 y 6, dos estomas colonizados por hifas.

En Mayo se obtiene mayor cantidad de micelio y biomasa que en otros meses Tabla 8 y Tabla 9, pero MEB no muestra esta relación debido al crecimiento endógeno de micelio.

En el mes de agosto (Láminas 3 y 4) se observa colonización superficial pobre en las hojas senescentes comparando con el censo de mayo. Las hojas jóvenes y maduras en agosto están un poco más colonizadas que en mayo. No hay diferencias notables entre los estadios de la hoja. En la hoja madura (Lámina 3, Figs.3 y 4) la cara abaxial (Fig.4) aparece más colonizada que la adaxial (Fig.3).

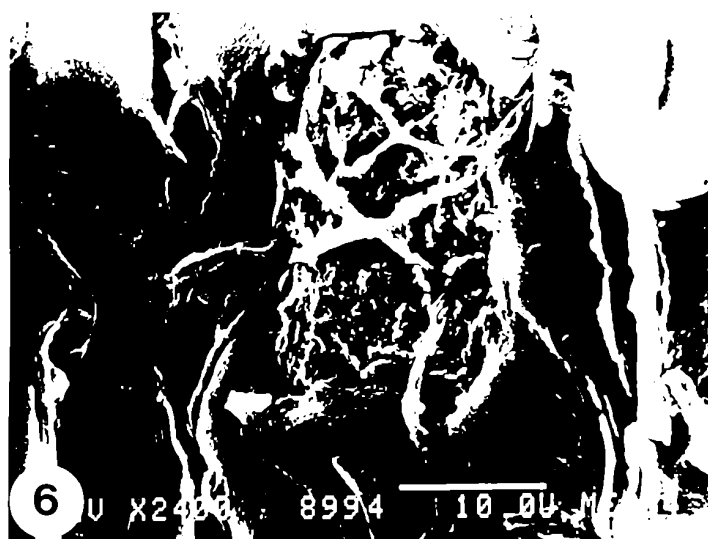
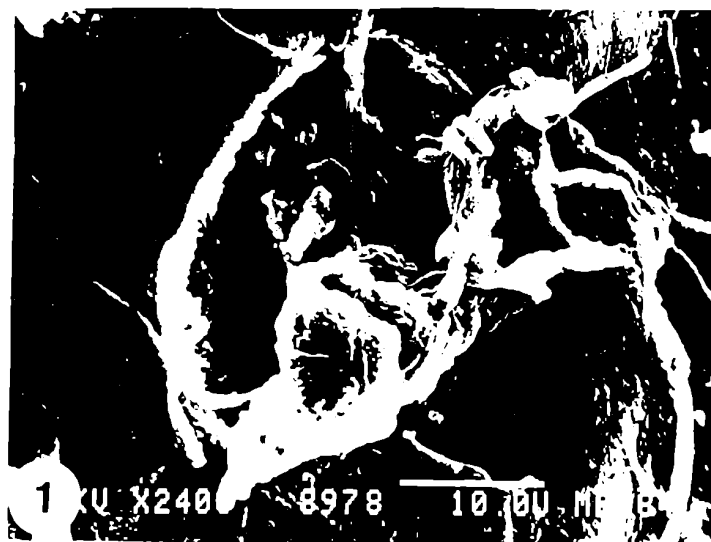
En la Lámina 4 se observan estomas colonizados por una red de hifas. En la Fig.1 de la misma lámina se observa un grano de polen.

En general un aumento de la colonización está relacionado con la madurez de la hoja (Dickinson, 1967; Gourbière, 1975; Mishra y Das, 1981; Kahlki et al., 1986; Legault et al., 1989). En este caso, la hoja madura está más colonizada superficialmente que la senescente. Esto puede deberse a: falta de nutrientes; presencia de inhibidores; finalización del ciclo vegetativo de los hongos que crecen sobre ella; determinando así que en la hoja senescente la longitud del micelio superficial sea menor que en la madura.

En este mes se observa: 1) menor colonización superficial; 2) menor cantidad de micelio pero la biomasa es mayor que en

LAMINA 4: Fotografías con microscopía electrónica de barrido de las superficies adaxial y abaxial de la hoja de *Pinus taeda*, correspondientes al mes de agosto **Fig.1:** hoja joven, cara adaxial; **Fig.2:** hoja joven, cara abaxial; **Fig.3:** hoja madura, cara adaxial; **Fig.4:** hoja madura, cara abaxial; **Fig.5:** hoja senescente, cara adaxial; **Fig.6:** hoja senescente, cara abaxial.

LAMINA 4



noviembre en hoja joven y madura; debido a la presencia de endofitos con hifas gruesas y de organismos que en invierno colonizan el interior de las hojas.

En el mes de diciembre (Láminas 5 y 6) se observa que las hojas jóvenes (de 4 meses) están muy poco colonizadas. Esto coincide con lo observado por Dickinson (1967) en hojas jóvenes de *Pisum sativum*.

También aparecen cristales de ceras epicuticulares, principalmente en la cara adaxial, debido posiblemente a la deposición diferencial de ceras epicuticulares, ya sea por cantidad o morfología, en ambas caras y eso da la textura diferente.

Se observa un aumento de colonización en la hoja madura que alcanza un máximo en la senescente. La cara adaxial está más colonizada que la abaxial. En esta última el crecimiento miceliano está localizado sobre los estomas (Lámina 5, Fig.6) mientras que en la cara adaxial toda la superficie está cubierta por hifas.

En la Lámina 6, Figs.3-6 se observan estomas con un alto grado de colonización fúngica. Se observan también conidióforos con conidios, Fig. 3 y abundante producción de conidios en la Fig.4.

En el mes de marzo (Láminas 7 y 8) las hojas jóvenes (de 7 meses) Figs.1 y 2 están más colonizadas en relación con las del censo anterior. En la Lámina 7 Fig.1 se observan cristales de ceras epicuticulares, principalmente en la cara adaxial, pero menos que en el censo de diciembre.

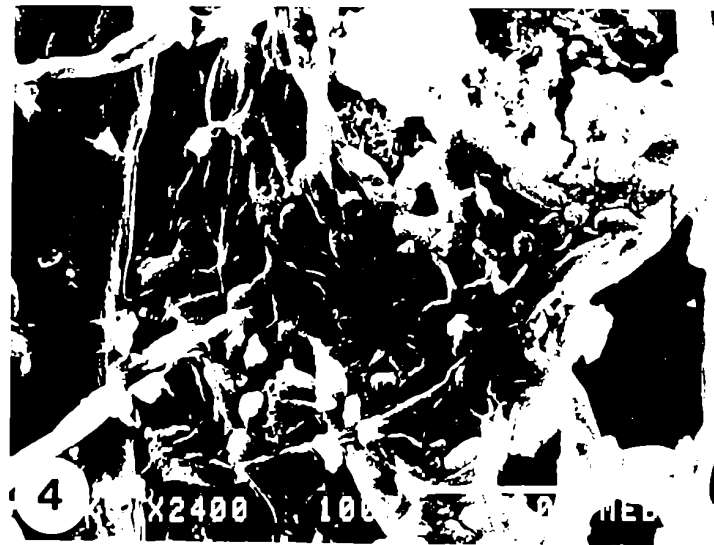
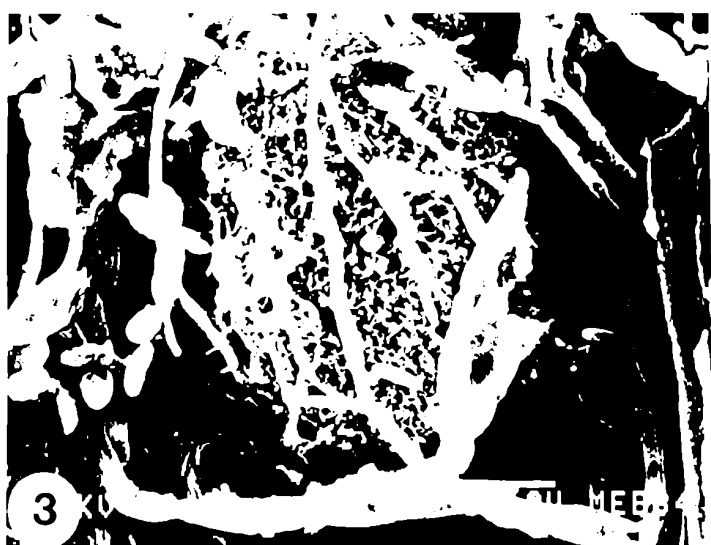
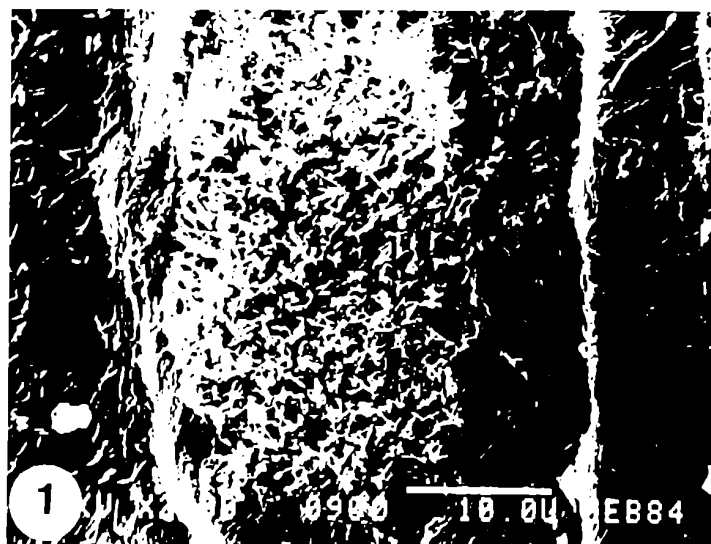
LAMINA 5: Fotografías con microscopía electrónica de barrido de las superficies adaxial y abaxial de la hoja de *Pinus taeda*, correspondientes al mes de diciembre. **Fig.1:** hoja joven, cara adaxial; **Fig.2:** hoja joven, cara abaxial; **Fig.3:** hoja madura, cara adaxial; **Fig.4:** hoja madura, cara abaxial; **Fig.5:** hoja senescente, cara adaxial; **Fig.6:** hoja senescente, cara abaxial.

LAMINA 5



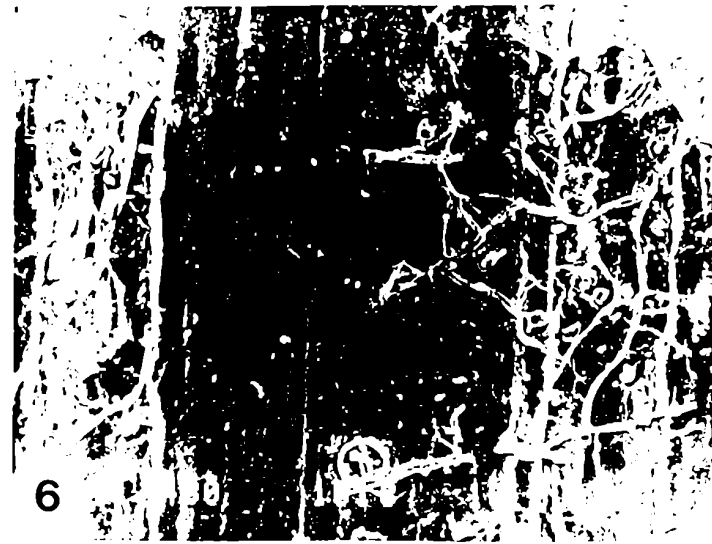
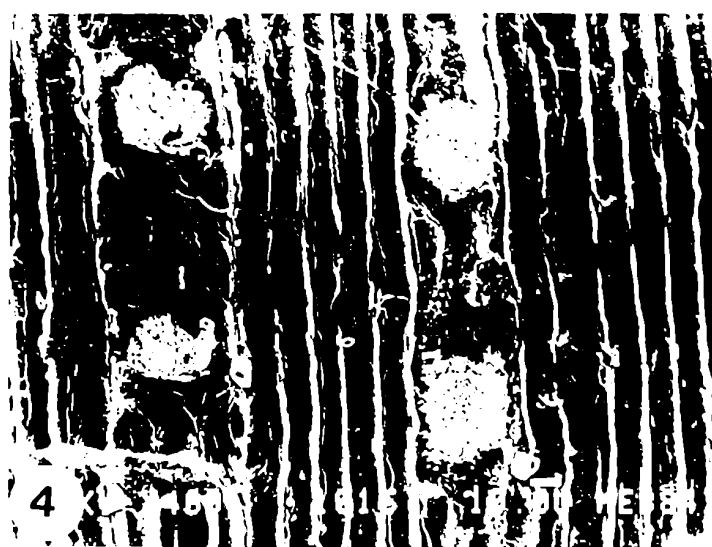
LAMINA 6: Fotografías con microscopía electrónica de barrido de las superficies adaxial y abaxial de la hoja de *Pinus taeda*, correspondientes al mes de diciembre. **Fig.1:** hoja joven, cara adaxial; **Fig.2:** hoja joven, cara abaxial; **Fig.3:** hoja madura, cara adaxial; **Fig.4:** hoja madura, cara abaxial; **Fig.5:** hoja senescente, cara adaxial; **Fig.6:** hoja senescente, cara abaxial.

LAMINA 6



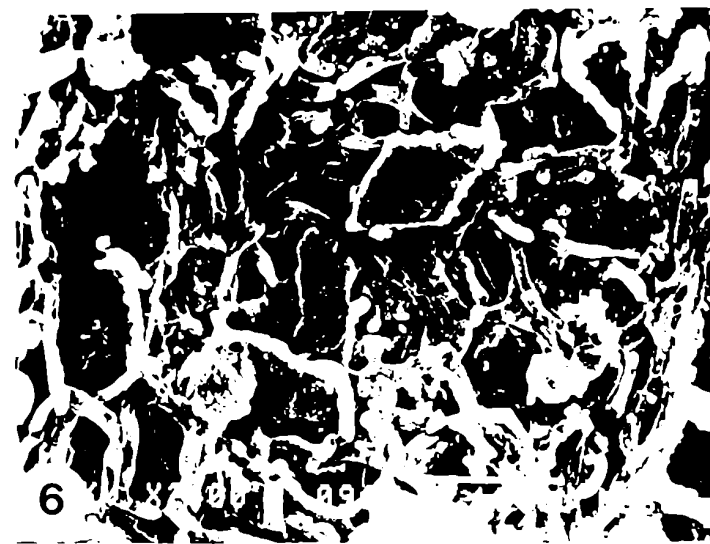
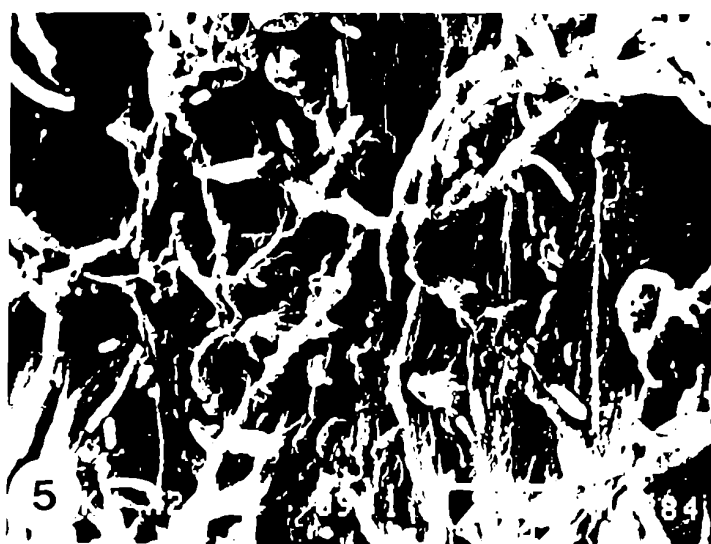
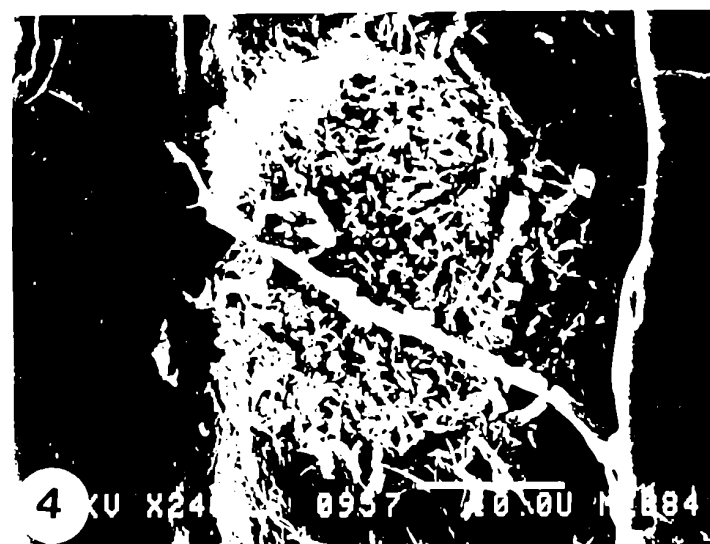
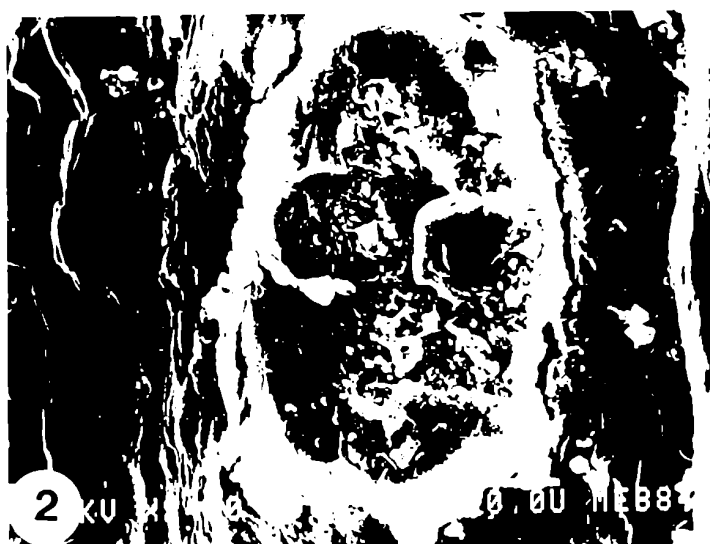
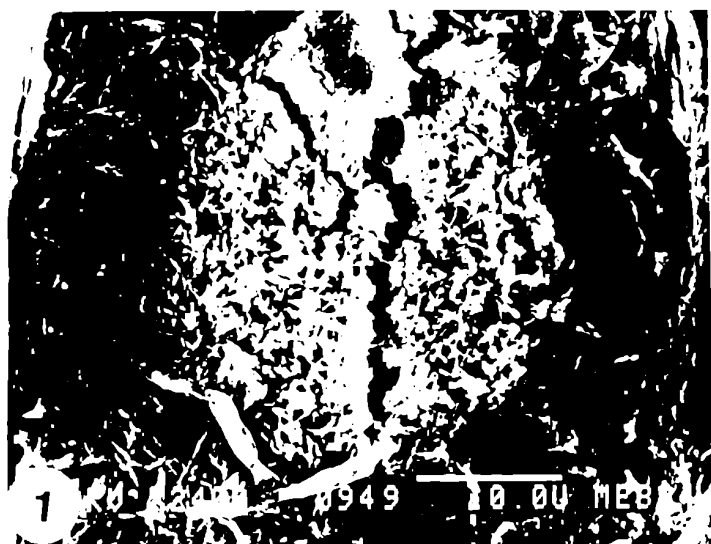
LAMINA 7: Fotografías con microscopía electrónica de barrido de las superficies adaxial y abaxial de la hoja de *Pinus taeda*, correspondientes al mes de marzo. **Fig.1:** hoja joven, cara adaxial; **Fig.2:** hoja joven, cara abaxial; **Fig.3:** hoja madura, cara adaxial; **Fig.4:** hoja madura, cara abaxial; **Fig.5:** hoja senescente, cara adaxial; **Fig.6:** hoja senescente, cara abaxial.

LAMINA 7



LAMINA 8: Fotografías con microscopía electrónica de barrido de las superficies adaxial y abaxial de la hoja de *Pinus taeda*, correspondientes al mes de marzo. **Fig.1:** hoja joven, cara adaxial; **Fig.2:** hoja joven, cara abaxial; **Fig.3:** hoja madura, cara adaxial; **Fig.4:** hoja madura, cara abaxial; **Fig.5:** hoja senescente, cara adaxial; **Fig.6:** hoja senescente, cara abaxial.

LAMINA 8



Posiblemente debido a la erosión por los agentes físicos que menciona Juniper (1991).

Tanto las hojas maduras como las senescentes están colonizadas en su cara adaxial, Lámina 7 Figs.3 y 5. Pero con respecto a la cara abaxial se observa mayor colonización en la hoja senescente Fig.6.

En la Lámina 8 se observa con mayor aumento 2400x los diferentes estadios y caras de las hojas. En la Fig.3 (hoja madura, cara adaxial) se muestra un conidióforo con conidios.

En las hojas senescentes se observa una densa red de hifas y conidios sobre los estomas (Fig.6).

6.B.4 LONGITUD DE MICELIO.

El objetivo es la estimación de micelio presente tanto dentro de los tejidos como en la superficie foliar en las diferentes estaciones del año y en tres estadios de madurez de la hoja (joven, madura, senescente).

En la Tabla 8 se incluyen los valores obtenidos por el método de la placa de agar ya citado en 5.10 y 5.10.2 que estima el micelio total sea activo o inactivo. Estos valores son la media de tres repeticiones y están expresados en metros por gramo de peso seco de hoja.

La tendencia general es un aumento de la cantidad de micelio desde la hoja joven a la senil en todos los meses de

	MAYO	AGOSTO	NOVIEMBRE	MARZO
JOVEN	2.89 ±0.13	1.52 ±0.38	1.67 ±0.42	1.86 ±0.08
MADURA	3.28 ±0.48	1.49 ±0.01	1.83 ±0.12	2.71 ±0.5
SEÑIL	3.37 ±0.69	2.16 ±0.15	2.94 ±0.33	3.01 ±0.48

TABLA 8: Longitud de micelio en las hojas de *Pinus taeda* en distintos estados de madurez y en las estaciones del año. Cada valor es la media de tres repeliciones ± d expresado en metros de micelio por gramo de peso seco de hoja.

muestreo, con excepción de agosto en que la hoja joven (1 año de vida) (1,52 m/gr) > madura (1,49 m/gr). El muestreo con valores mayores totales es mayo.

También se puede señalar que hay un aumento gradual desde fin del invierno hasta otoño, que se puede correlacionar con el aumento de la temperatura. Los valores altos de mayo pueden deberse al crecimiento y acumulación de micelio durante el período estival incrementado por los valores máximos de la humedad relativa que se dan en mayo. En los meses fríos habría crecimiento reducido sumado a posible muerte y predación.

A los datos obtenidos se les aplicó un ANOVA de dos factores (meses del año vs. estados de madurez). Se obtuvo diferencias significativas entre los niveles de cada factor y en la intersección (F.edad 2,24=27; F.meses 3,24=38,67 y F.int.6,24=3,14, $P<0,05$).

Al ser significativa la interacción se hicieron pruebas de efecto simple y se obtuvo que la hoja joven tiene diferencias significativas en las diferentes estaciones; con la hoja madura y senescente ocurrió lo mismo. En el mes de mayo no hubo diferencias significativas en los tres estadios de la hoja. En los meses restantes agosto, noviembre y marzo las diferencias de micelio en los distintos estadios resultaron significativas estadísticamente.

Finalmente se hicieron contrastes según Tukey y se obtuvo que los meses de noviembre y marzo no son estadísticamente diferentes ($P<0,05$) en cuanto a la cantidad de micelio.

Estos valores se comparan con el total de colonias filamentosas, TCF, el porcentaje de humedad de los tejidos, las observaciones con MEB, de cada estadio de la hoja y en cada estación del año y por último con los datos climáticos correspondientes a los meses de muestreo.

6.B.5 BIOMASA FUNGICA

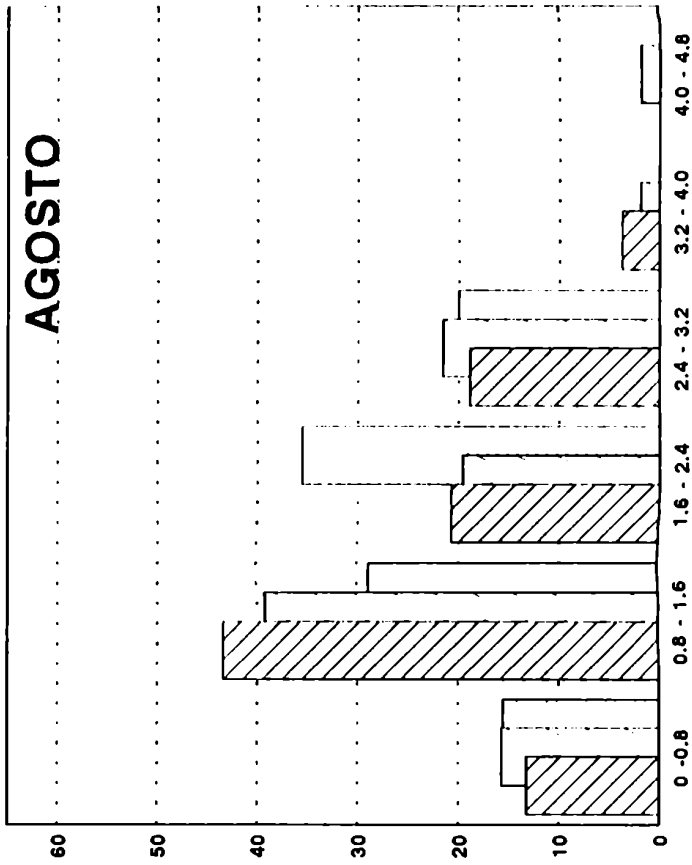
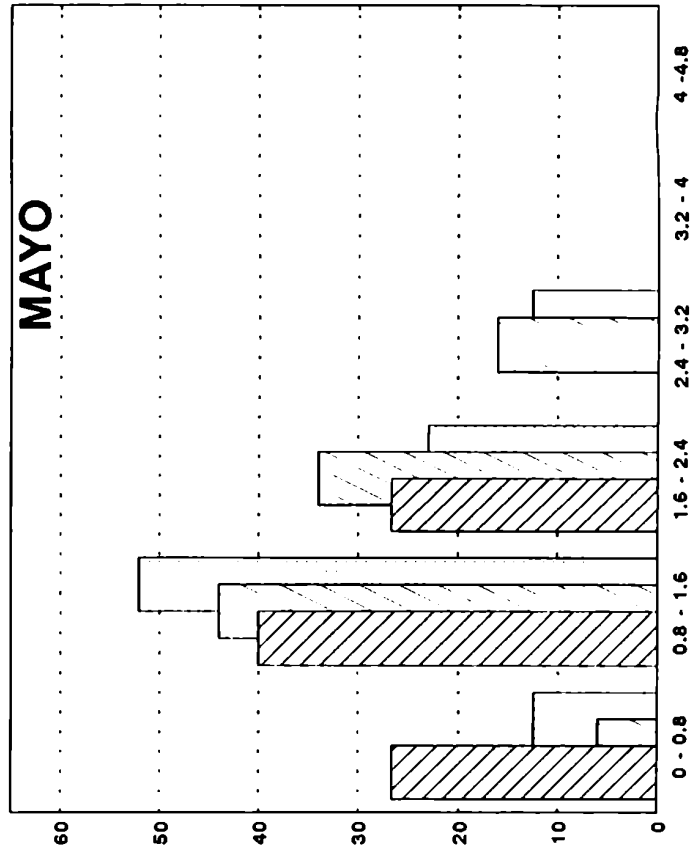
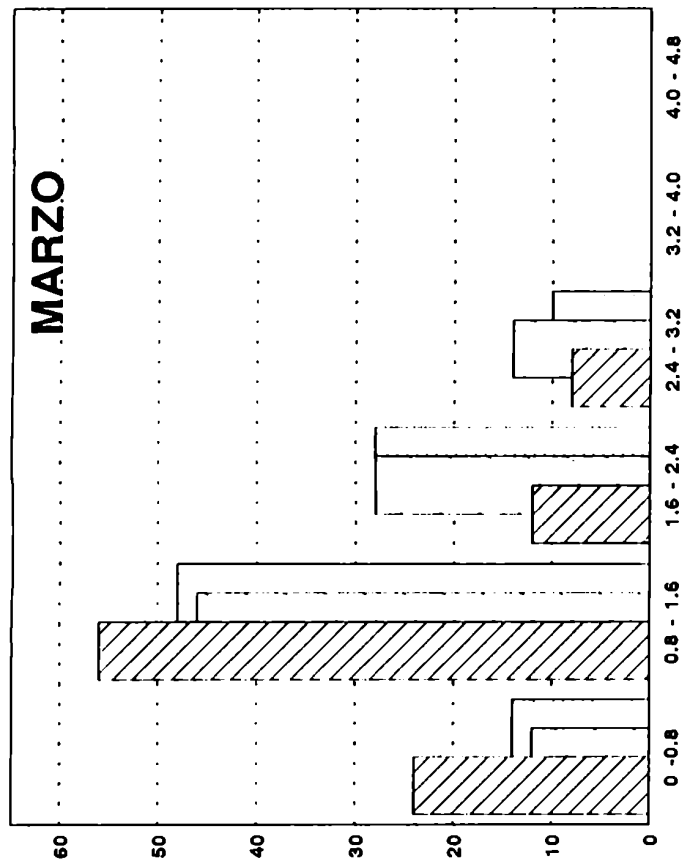
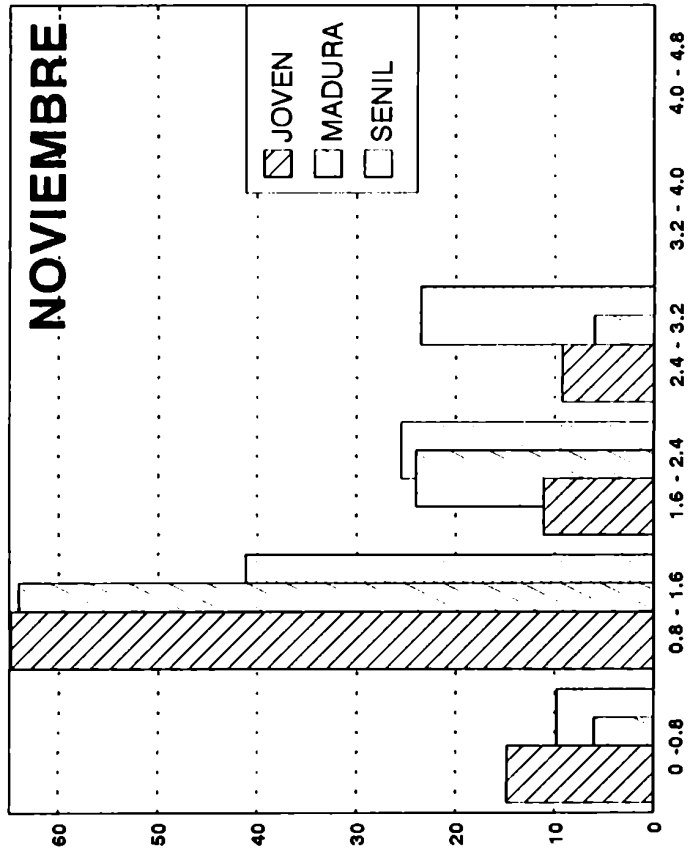
Las mediciones del diámetro hifal (Fig.12) dieron como resultado una mayor proporción de hifas con diámetro pequeño en el muestreo de noviembre (primavera), en todos los estadios de la hoja; esta proporción se hizo menor en los muestreos de marzo y mayo, apareciendo en el invierno valores exclusivos de diámetro (3,2-4,8M).

Los datos de biovolumen obtenidos a partir de las mediciones de longitud y diámetro de micelio pueden verse en la Tabla 10

Los resultados de biomasa fúngica obtenidos a partir de los datos de biovolumen y densidad fúngica (5.11) pueden verse en la Tabla 9. Los valores mayores corresponden al mes de mayo coincidiendo esto con los porcentajes máximos de humedad relativa Fig.1

En el censo de marzo se obtuvieron valores menores de biomasa con respecto a mayo, debido a la humedad relativa baja y menor cantidad de lluvia caída, aunque la temperatura media mensual de 23,13°C es adecuada para el crecimiento fúngico.

FIGURA 12: Diámetros micelianos en los distintos estadios de la hoja y en los diferentes muestreos. Las medidas están dadas en μm .



	MAYO	AGOSTO	NOVIEMBRE	MARZO
JOVEN	8.507×10^{-3}	6.465×10^{-3}	4.814×10^{-3}	4.973×10^{-3}
MADURA	13.47×10^{-3}	6.118×10^{-3}	5.801×10^{-3}	10.06×10^{-3}
SEÑIL	11.67×10^{-3}	9.203×10^{-3}	12.67×10^{-3}	10.28×10^{-3}

TABLA 9: Medidas de biomasa de micelio en las hojas de *Pinus taeda* en distintos estadios de madurez y en las estaciones del año. Cada valor está expresado en mg de micelio por gramo de peso seco de hoja.

	MAYO	AGOSTO	NOVIEMBRE	MARZO
JOVEN	7.734×10^{-3}	5.878×10^{-3}	4.377×10^{-3}	4.521×10^{-3}
MADURA	12.25×10^{-3}	5.562×10^{-3}	5.274×10^{-3}	9.149×10^{-3}
SENIL	10.61×10^{-3}	8.367×10^{-3}	11.52×10^{-3}	9.345×10^{-3}

TABLA 10: Medidas de biovolumen de micelio en los distintos estadios de madurez de la hoja y en las diferentes estaciones. Cada valor está expresado en mm^3/g de peso seco de hoja.

Se observa una tendencia al aumento de biomasa desde la hoja joven a la senescente en todas las estaciones menos en mayo que se obtiene más biomasa en la hoja madura ($13,47 \times 10^{-3}$ mg) que en la senescente ($11,67 \times 10^{-3}$ mg).

Hay que destacar que el micelio, medido en m/g de peso seco, es mayor en noviembre respecto a agosto pero en este último se obtienen diámetros hifales mayores (Fig.12) lo que da como resultado una mayor biomasa en hoja joven y madura.

Las esporas de los microorganismos son trasladadas a la superficie de la hoja por diversos agentes (viento, agua etc). Después que la espora alcanza la superficie de la hoja la adhesión y retención sobre ella es afectada por las características físicas de la hoja y la humectabilidad de la misma (Allen et al., 1991). La adhesión a veces está acompañada por la interacción de la superficie de la hoja con los materiales segregados por el micelio (Hamer et al., 1988).

El reconocimiento de las señales químicas y topográficas por el tubo germinativo se denomina quimiotropismo y ligmotropismo (Staples et al., 1984). El crecimiento orientado ocurre debido a los problemas topográficos de elevaciones y depresiones que dan la señal en la orientación del crecimiento.

Allí son expuestas a desecación, radiación y contacto con diversas sustancias que hacen del filo plano un medio con alto stress/alto disturbio que selecciona a los organismos capaces de vivir en esas condiciones o de esporular (Pugh, 1980;

Andrews, 1992).

Los cambios climáticos en la superficie de la hoja, como la duración de la sequía o humedad, del frío o calor y el grado de exposición, son importantes no sólo en la germinación de las esporas sino en la sobrevivencia de los microorganismos. A veces las fluctuaciones diarias de estos parámetros suelen ser muy rápidos y extremos.

Las superficies de las hojas proveen un habitat con nutrientes que provienen de exudados y que están influenciados por la edad y las condiciones de la planta en general. Las hojas viejas tienen las superficies más dañadas (Juniper, 1991), ésto le permite a los microorganismos obtener nutrientes y acceder a los tejidos más profundos de la hoja para su colonización.

Las comunidades que se establecen en el filoplano están determinadas por las esporas del aire y la morfología de la superficie de las hojas que actúa como una trampa (Allen et al., 1991).

La superficie de la hoja crea condiciones microclimáticas. El micelio fúngico está relativamente bien adaptado para crecer en ellas siguiendo diferentes patrones. Muchas especies producen polisacáridos y glicoproteínas que le permite al micelio adherirse a la superficie foliar. Los hongos patógenos no son capaces de sobrevivir largo tiempo sobre la superficie de la planta pero penetran rápidamente los tejidos después de "aterrizar" sobre ella y formar apresorios (Isaac, 1992).

Existen distintos esquemas de crecimiento superficial, puede ser perpendicular a las depresiones o bien siguiendo las zonas más bajas de la superficie.

Godfrey (1974) observó que *C. herbarum* y *A. pullulans* ocupaban las depresiones de la pina y las nervaduras de *Pteridium aquilinum*.

Collins (1976) obtuvo germinación diferencial de esporas de *C. cladosporioides* sobre la nervadura media con respecto a la lámina de *Antirrhinum* sp., relacionado con la mayor producción de exudados sobre la nervadura (Pesante, 1963).

En *Hippophae rhamnoides*, Lindsey y Pugh (1976) observaron que *A. pullulans* crece en el surco de la nervadura media y en los tricomas.

Bernstein y Carroll (1977) encontraron diferentes patrones de colonización en ambas caras de las hojas de *Pseudotsuga menziesii*. En la depresión de la vena media en la cara adaxial y asociado con los estomas abaxiales observaron el alga verde *Protococcus viride*. Las hifas oscuras crecían paralelas al eje longitudinal de la hoja con puentes cortos entre ellas, en la cara adaxial primero y luego en ambas caras; las hifas hialinas en cambio aparecieron en la cara abaxial, paralelas a las hileras de estomas y también dentro de ellos.

Hopkin et al., (1988) trabajando con *Pinus contorta* encontraron que el micelio de los hongos del filo plano sigue la unión entre células. La colonización en *P. taeda* no sigue un patrón determinado que pueda interpretarse como una

respuesta exclusivamente tigmotrópica. Sin embargo las ramificaciones se comportan normalmente formando un ángulo de 90° (Lámina 5, Fig.5).

Estudiando la colonización superficial de la hoja por los hongos, Dickinson (1967), Bernstein y Carroll (1977), y McBride y Hayes (1977) encontraron que el desarrollo hifal aumenta en relación con la edad de la hoja, como también ocurre en *P. taeda* (Láminas 1,3,5 y 7, Figs.5 y 6) y existen diferencias entre la cara abaxial y adaxial de la hoja (Bernstein y Carroll (1977) y McBride y Hayes (1977)).

En las hojas de *Pinus taeda* ambas caras abaxial y adaxial están igualmente expuestas a la lluvia de esporas y otras partículas (polen, polvo, etc) desde la atmósfera debido a sus características morfológicas.

Las hojas jóvenes de *Pinus taeda* están limpias desde el punto de vista micológico. Los propágulos que son diseminados por el aire tienen tendencia a adherirse más en la cara adaxial, de textura áspera, debido a la mayor concentración de cristales de ceras epicuticulares y células epidérmicas con prolongaciones papilosas.

Como consecuencia de esto se observa un desarrollo de micelio mayor sobre la superficie de la cara adaxial. Wildman y Parkinson (1979) encontraron el mismo patrón de colonización que atribuyen al mayor número de esporas en contacto con la superficie y observaron que sólo aumenta la cantidad de micelio en la cara abaxial con el envejecimiento de la hoja, mientras que en la adaxial la disponibilidad de

fuelle carbonada limita su crecimiento.

En cambio Pugh y Buckley (1971) rara vez observaron estructuras fúngicas sobre la cara abaxial de *Acer pseudoplatanus*, que es la que posee estomas, venas que sobresalen y excrescencias; en cambio en la cara superior que es lisa el micelio es abundante.

Sherwood y Carroll (1974) relacionaron las diferencias morfológicas de ambas caras de las hojas de *Pseudotsuga menziesii* con las especies fúngicas que colonizan cada cara.

McBride y Hayes (1977) encontraron mayor crecimiento miceliano en la cara inferior que en la superior de las hojas de *Larix decidua*.

Breeze y Dix (1981) señalaron que en las hojas de *Acer platanoides* hay más propágulos en la cara adaxial pero la germinación y el desarrollo hifal es mayor en la abaxial, debido a la menor competencia, protección de la luz solar, menor lavado de nutrientes por la lluvia y mayor número de estomas que determinan mayor humedad.

Baker et al. (1979) mencionaron la pubescencia abaxial de las hojas de *Metrosideros* sp. como factor determinante para atrapar y retener esporas, además observaron fumaginas en la cara abaxial e hifas fúngicas en las pubescencias.

De acuerdo a lo observado en *P. taeda* podríamos postular que la colonización se inicia por la cara adaxial en la hoja joven y progresa hasta colonizar ambas caras en la hoja

madura y senescente. La cara adaxial suele estar más colonizada; esta diferencia es menos notable en la senescencia. Los estomas son las zonas de mayor densidad hifal. En los censos de primavera y verano se observa mayor colonización superficial mientras que en otoño- invierno hay menos micelio en el filoplano; posiblemente los valores altos de mayo se deban a micelio endógeno.

Hudson (1968) encuentra que los primeros colonizadores (*C. herbarum*, *A. alternata*, *E. purpurascens*, *A. pullulans* y *B. cinerea*) llegan a la superficie de la hoja como esporas y colonizan rápidamente la superficie disponible.

Dickinson (1965), Ruscoe (1971), Pugh y Buckley (1971), Godfrey (1974), Lindsey y Pugh (1976) y Dickinson y Preece (1976) encontraron que el aumento en la colonización foliar total es anterior a la senescencia de la hoja.

Con el envejecimiento y por disminución de la resistencia de la cutícula hay invasión hacia el tejido de la hoja senescente por los hongos del filoplano (Kerling, 1964; Ruscoe, 1971; Lindsey y Pugh, 1976). La humedad remanente en estos tejidos es suficiente para permitir el crecimiento a pesar que sus valores están por debajo de los obtenidos en la hoja joven. Bernstein y Carroll (1977) encontraron que la población microbiana responde a variaciones de temperatura, humedad, luz, disponibilidad relativa de las sustancias disueltas en las hojas y la presión de selección de los microartropodos que comen el micelio presente en la hoja. En nuestra experiencia en otoño se obtienen los valores mayores

para longitud de micelio y biomasa, coincidiendo ésto con la mayor humedad relativa (Tabla 8 y 9; Fig.1).

No existen estudios acerca del diámetro hifal de los hongos que colonizan la filosfera. En *Pinus taeda* la evolución encontrada en la colonización puede interpretarse como un aumento desde primavera al invierno. En noviembre, todas las hojas pero en especial en las jóvenes y las maduras los hongos están en activo crecimiento ya sea porque han comenzado la colonización de la hoja (es el caso de la hoja joven) o bien porque han retomado el crecimiento (es el caso de la hoja madura). A medida que transcurre el tiempo de colonización las paredes se engrosan y el diámetro aumenta, aumentando así la biomasa final.

6.B.6 ANALISIS DE LAS POBLACIONES FUNGICAS.

El análisis de las poblaciones fúngicas en diferentes estaciones del año y distintos estadios de la hoja tuvo como objetivo determinar: a) Las posibles diferencias en la composición de las comunidades y/o b) En el grado de colonización en relación a las estaciones del año y/o c) Los estadios de la hoja; d) Determinar la existencia o no de especies características de una dada estación o un estadio y e) Proponer una posible sucesión fúngica en la hoja viva de *P. taeda*.

Los datos obtenidos aquí se comparan con los de longitud de micelio, porcentaje de humedad de las muestras, datos

climáticos y observaciones con MEB de las hojas para los diferentes estadios y estaciones del año.

En la Tabla 11 figura la lista de todas las especies aisladas, con la frecuencia correspondiente a cada una de ellas en cada estadio de la hoja, joven, madura, senescente y en cada estación del año obtenidas por el método de lavado de Williams et al. (1965), (5.9.1).

El muestreo del mes de mayo se realizó el día 12, correspondiendo a otoño; en agosto, el día 20, fin del invierno; en noviembre, día 27, primavera tardía y en marzo se tomaron las muestras el día 6, verano tardío.

Las cepas aisladas y fértiles están en su mayoría identificadas taxonómicamente hasta especie; para las no identificadas se utilizaron las mismas siglas que para 6.A.6 (IND, MME, MDE, NA).

Se sembraron 40 trozos de hoja de cada estado de madurez por estación y los valores de frecuencia obtenidos se refirieron a 100 a fin de poderlos comparar.

En el censo de otoño se aislaron 130 TCFL en hoja joven, de las cuales 110 corresponden a TCF y 20 a levaduras; en hoja madura 110 TCFL, de las cuales 100 TCF y 10 colonias de levaduras; en hojas senescentes 82,5 TCFL, de los cuales 80 TCF y 2,5 a levaduras.

En este censo el grado de colonización es mayor en hoja joven respecto a senescente tanto para TCFL (J:130, M:110, S:82) como para TCF (J:110, M:100, S:80). De acuerdo a lo ya citado, las hojas senescentes suelen estar más colonizadas

TABLA 11: Frecuencia (%) de las especies fúngicas, aisladas por el método de lavado, de la filosfera de *Pinus taeda* en diferentes estados de madurez de las hojas y en las estaciones del año.

ESPECIES	MAYO			AGOSTO			NOVIEMBRE			MARZO		
	JOVEN	MADURA	SEÑIL	JOVEN	MADURA	SEÑIL	JOVEN	MADURA	SEÑIL	JOVEN	MADURA	SEÑIL
<i>Pestalotiopsis oxysanthi</i>	47.5	10	5	42.5	47.5	85		37.5	22.5		12.5	5
<i>Alternaria alternata</i>	15	12.5	7.5	5	10	2.5		2.5	22.5	27.5	25	20
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		20	12.5	2.5			2.5	12.5	17.5	2.5	7.5	5
<i>Cladosporium oxysporum</i>			7.5	2.5					2.5		2.5	5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>		10	2.5			2.5					2.5	7.5
<i>Xylomyces curta</i>	5	2.5	2.5	2.5	2.5		2.5					2.5
<i>Nigrospora oryzae</i>		5	5	7.5					7.5	2.5	10	
<i>Fusarium sulphureum</i>	2.5											
<i>Fusarium lateritium</i>	10	2.5										
<i>Fusarium oxysporum</i>		2.5										
<i>Epitoccum purpurascens</i>	5	2.5					5	10	15	12.5	15	2.5
<i>Leptosphaerulina aff. australis</i>	2.5											
<i>Penicillium sp.</i>		5		5					2.5			
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>		2.5										
<i>Wardomyces aff. inflatus</i>		2.5	2.5							2.5		2.5
<i>Eurolium rubrum</i>		2.5										
<i>Paecilomyces sp.</i>		2.5										
<i>Hormonema dematioides</i>			2.5	5	5		12.5	15		67.5		5
<i>Acremonium strictum</i>					5							
<i>Drechslera bicolor</i>							2.5					
<i>Pithomyces chartarum</i>										2.5	2.5	
<i>Scytalidium thermophilum</i>											2.5	
<i>Phoma pomorum</i>										2.5	2.5	
<i>Chaetomium globosum</i>										2.5		2.5
<i>Pseudomortera coffea</i>												
IND 71	2.5											
IND 27		2.5										
IND 29		2.5										
IND 4			2.5									
IND 24			2.5									
IND 268				2.5								
IND 442										2.5		
MME 1								2.5	2.5			
MME 2												2.5
MME 3				2.5	2.5							
MME 4									2.5			
MME 5		2.5	7.5									
MME 6									2.5			
MME 7		2.5										
MME 8									2.5			
MME 9			2.5									
MME 10					2.5							2.5
MME 11								2.5				2.5
MME 12					2.5							
MDE 1										2.5	10	
MDE 2					2.5							2.5
MDE 3					2.5							
MDE 4				2.5								
Lavaduras	20	10	2.5	30	7.5	2.5	50	20		42.5	25	45
NA	20	7.5	17.5	25	10	7.5	5	37.5	32.5	15	17.5	37.5
TCF	110	100	80	105	92.5	97.5	30	120	132.5	140	102.5	115
TCFL	130	110	82.5	135	100	100	60	140	132.5	182.5	127.5	160

ANEXO TABLA 11

HYPHOMYCETES

Acremonium strictum W. Gams
Alternaria alternata (Fr.) Keissler
Cladosporium cladosporioides (Fresen.) de Vries
Cladosporium oxysporum Berk. & Curt.
Cladosporium sphaerospermum Penz.
Drechslera bicolor (Mitra) Subram. & Jain
Drechslera dematioidea (Bubák & Wróblewski) Subram. & Jain
Epicoccum purpurascens Ehrenb. ex Schlecht.
Fusarium lateritium Nees
Fusarium heterosporum Nees ex Fr.
Fusarium oxysporum Schlecht
Fusarium semitectum Berk. & Rav.
Fusarium sulphureum Schlechtendahl
Fusarium sp.
Hormonema dematioides Lagerberg & Melin
Nigrospora oryzae (Berk. & Br.) Petch.
Paecilomyces sp.
Penicillium sp.
Pithomyces chartarum (Berk. & Curt.) M.B.Ellis
Scytalidium thermophilum (Cooney & Emerson) Austwick
Wardomyces aff. *inflatus* (Marchal) Hennebert
Xylohypha curta (Corda) Hughes

ASCOMYCETES

Leptosphaerulina aff. *australis* Mc Alp.
Eurotium rubrum Koning. Spieckermann & Bremer
Chaetomium globosum Kunze ex Fr.
Pseudomorfea coffeae Punith.

COELOMYCETES

Pestalotiopsis oxyanthi (Thuem.) Stey.
Microsphaeropsis olivacea (Bonord.) Hohn.
Phoma pomorum Thum.

ZYGOMYCETES

Mucor hiemalis Wehmer f. *hiemalis*

por su deterioro superficial que le permite permear las sustancias nutritivas de su interior.

Los datos obtenidos conducirían a pensar en la existencia de otro factor más importante, que el tiempo de colonización. Las hojas jóvenes y maduras están más expuestas por su posición en la rama a la lluvia de esporas fúngicas de la atmósfera. Si a esto se agrega las condiciones climáticas del Delta con temperatura y humedad favorable al crecimiento fúngico, las hojas jóvenes y maduras podrían alcanzar un grado de colonización mayor en menor tiempo, completando su ciclo rápidamente.

En general las levaduras son dominantes (20%) en hoja joven, disminuyendo notablemente (10%) en la madura y siendo aún menor (2,5%) en la senescente, Pandey (1990) obtiene resultados similares en *Psidium guajava*.

Las especies filamentosas *P. oxyanthi*, *A. alternata* y *X. curta* fueron aisladas en otoño en todos los estadios. La primera de ellas predomina en las hojas jóvenes con una frecuencia de 47,5 %, decreciendo con la edad de la hoja, 10 % en las maduras y 5 % en las senescentes. *A. alternata* en otoño sigue la misma tendencia (Joven: 15, Madura: 12,5, Senescente: 7,5).

Las especies del género *Cladosporium* no fueron aisladas en las hojas jóvenes. En las hojas maduras y senescentes *C. cladosporioides* alcanza los valores más altos (M:20, S:12,5).

Los restantes taxa se aislaron con valores de frecuencia menores que 5%, con excepción de *N. oryzae*, *F. lateritium*, *E.*

purpurascens, *Penicillium* sp. y MME5.

Se aislaron en 6.B.6 428 cepas de hifomicetes, de los que resultaron 48 especies diferentes. A los que hay que agregar las especies de levaduras que se incluyeron todas en un grupo. En el censo de otoño se aislaron 27 especies distintas para los tres estadios de hojas, correspondiendo 9 a las hojas jóvenes, 19 a hojas maduras y 14 a hojas senescentes. De acuerdo a esto hay mayor diversidad en hojas maduras seguido por las senescentes y por último las hojas jóvenes.

En la Tabla 12 se discrimina el porcentaje de especies Moniliáceas y Dematiáceas tanto sobre TCFL como TCF para cada estadio de la hoja. Se observa predominio de especies Dematiáceas en todos los estadios y tanto en TCFL como TCF.

En *Nothofagus truncata*, Ruscoe (1971) observó una tendencia hacia la epifilia de especies fumaginoides y colonias bifales hialinas hipófilas.

Si la hipótesis propuesta por muchos autores sobre la susceptibilidad de los organismos Moniliáceos a la irradiación fuese acertada, se esperaría porcentajes menores de los mismos en zonas de mayor irradiación como lo son las hojas jóvenes, por su posición en la rama y en la copa; pero no ocurre así ya que los porcentajes mayores se dan en hoja joven: 29,5 para TCFL y en hoja madura: 21,6 para TCF o sea que la tendencia no coincide con lo esperado. También Dickinson, (1976) había dudado de esa hipótesis y había propuesto reconsiderarla.

En el censo de agosto se aislaron de la hoja joven, (tiene

		MAYO			AGOSTO			NOVIEMBRE			MARZO		
		Joven	Madura	Senescente	Joven	Madura	Senescente	Joven	Madura	Senescente	Joven	Madura	Senescente
TCFL	Especies Dematiaceas	70.5	70.7	80.8	65.9	77.8	97.3	33.3	75.6	87.5	74.6	77.3	57.1
	Especies Moniliaceas	29.5	29.3	19.2	34.1	22.2	2.7	66.7	24.4	12.5	25.4	22.7	42.9
TCF	Especies Dematiaceas	86.1	78.4	94	90.6	85	100	100	94	87.5	100	100	90.3
	Especies Moniliaceas	13.9	21.6	16	9.4	15	0	0	6	12.5	0	0	9.7

TABLA 12: Porcentaje de especies moniliáceas y dematiáceas en cada uno de los muestreos y estadios de madurez de la hoja sobre TCFL (colonias filamentosas y levaduras) y sobre TCF (colonias filamentosas).

1 año de edad, ya que es de la primavera del año anterior), 135 TCFL de los cuales 105 corresponden a TCF y 30 a levaduras.

En hoja madura 100 TCFL, 92,5 TCF y 7,5 levaduras y de hoja senescente se aislaron 100 TCFL, de los cuales 97,5 corresponden a TCF y 2,5 a levaduras.

Cabe destacar que la hoja joven (1 año de vida) es la que tiene mayor grado de colonización tanto en TCFL(135) como TCF(105). Podríamos postular que la colonización se inicia en los primordios y se incrementa hasta cierto punto de la hoja madura, pero no indefinidamente, porque el micelio muere, es comido o hay menos nutrientes, en las hojas senescentes tenemos menor cantidad de propágulos vegetativamente activos. Las hojas maduras y seniles de agosto presentan similar colonización y menores que las jóvenes.

Al igual que en el censo anterior hay un predominio de levaduras en las hojas jóvenes.

Con respecto a los principales componentes de la flora fúngica de este censo podría decirse que son *P. oxyanthi*, *A. alternata* y las levaduras. *P. oxyanthi* está presente en todos los estadios y con frecuencias altas, P:47,5, J:42,5, M:47,5, S:85.

A. alternata se lo encontró en las hojas jóvenes y maduras, con valores altos de frecuencia mientras que en las senescentes no fue así.

Las especies de *Cladosporium* y *X. curta* fueron esporádicas y con frecuencias < 5%.

Se aisló *Hormonema dematioides* en todos los estadios menos en los senescentes. *Nigrospora oryzae*, *E. purpurascens*, *Penicillium* sp. y *Acremonium strictum* se aislaron sólo de algunos estadios. Las restantes especies aparecen esporádicamente con frecuencias < 5%.

De las 49 especies presentes en todos los censos; en el de agosto se aislaron 19 especies diferentes para los tres estadios; a las hojas jóvenes corresponden 12 especies, 11 a hoja madura y 4 a hojas senescentes.

Con respecto al porcentaje de especies Moniliáceas y Dematiáceas (Tabla 12), se mantiene la misma tendencia que en el censo anterior; las especies Dematiáceas predominan en todos los estadios de las hojas tanto en TCFL como TCF. Las especies Moniliáceas tienen porcentajes muy bajos (9.4, 15.2, 0) en todos los estadios de las hojas sobre TCF, incluso no están representadas en las hojas senescentes. En TCFL los porcentajes de especies Moniliáceas son mayores (34.1, 22.2, 2.7) debido al aporte de las levaduras.

En el censo de noviembre se aislaron 80 TCFL de las hojas jóvenes, de las cuales 30 corresponden a TCF y 50 a levaduras; en hojas maduras 140 TCFL, 120 TCF y 20 levaduras; en hoja senescente las levaduras estuvieron ausentes y TCFL=TCF=132,5. Únicamente en este censo se encuentra una tendencia en TCF, acorde con lo citado por otros autores respecto al aumento del grado de colonización con la edad de las hojas (J:30, M:120, S:132,5).

Con respecto a TCFL hay un aumento de colonización de J:80 a M:140, pero no aumenta en S:132,5 debido a la ausencia de levaduras en este estadio.

Hay que aclarar que las hojas jóvenes de noviembre, tienen 3 meses de vida, ya que son los primordios observados en agosto que ya están desplegados.

También hay que destacar que el grado de colonización de las hojas maduras y senescentes es similar y considerablemente mayor que en las jóvenes. Se puede pensar que la colonización en las primeras etapas evoluciona a mayor velocidad y luego se frena dando como resultado que la hoja madura sea semejante a la senescente en cuanto a la colonización como ocurre también en otros sustratos.

Las levaduras mantienen la misma tendencia que en los dos censos anteriores, o sea frecuencias mayores en hojas jóvenes y menor en senescentes (en este censo 0).

Los hongos filamentosos, *P. oxanthi* y *A. alternata* están presentes en hojas maduras y senescentes, ausentes en jóvenes. *C. cladosporioides* y *E. purpurascens* están presentes en todos los estadios, pero con frecuencias bajas en hojas jóvenes. *Hormonema dematioides* que ya estaba presente en el censo anterior, ahora tiene frecuencias mayores y sigue ausente en hojas senescentes. Las restantes especies se dan con frecuencias < 5% y en general en un sólo estadio, con excepción de *N. oryzae* en hojas senescentes 7,5.

En este censo se aislaron 16 cepas diferentes; en las hojas jóvenes están presentes 6 especies diferentes, en las

maduras 8 y en las senescentes 11.

Con respecto al porcentaje de especies Moniliáceas y Dematiáceas, Tabla 12, se dan ciertas diferencias en cuanto a la tendencia observada en los censos anteriores que merecen comentarse. En hoja joven y TCFL se observa un porcentaje mayor de especies Moniliáceas 66,7 respecto a Dematiáceas 33,3. En los otros estadios, tanto en las maduras como en las senescentes, siguen predominando las Dematiáceas. Además no hay relación con la irradiación y el porcentaje de Moniliáceas, ya que J:66,7, M:24,4 y S:12,5, siendo estas últimas las más protegidas de la irradiación. En estos valores mencionados evidentemente la frecuencia de las levaduras en hoja joven, 50, tiene influencia definitoria.

En cuanto a TCF las especies Dematiáceas predominan en todos los estadios y las Moniliáceas guardan una relación acorde con lo esperado según la literatura J:0, M:6,1, S:12,5.

En el censo de marzo se aislaron de hoja joven 182,5 TCFL de las cuales 140 son TCF y 42,5 levaduras. En hoja madura tenemos 127,5 TCFL de los cuales 102,5 son TCF y 25 levaduras. En hoja senescente tenemos 160 TCFL, 115 TCF y 45 levaduras. La tendencia es que en hoja joven hay mayor grado de colonización tanto en TCFL como en TCF; en la hoja madura disminuye la frecuencia de ambos (TCFL y TCF) y en hoja senescente aumenta. Si buscamos similitud con alguno de los censos anteriores podríamos decir que la tendencia TCF y también en parte TCFL es similar al censo de agosto.

Las levaduras en marzo no mantienen la misma tendencia de los censos anteriores, (en hoja senescente siempre la frecuencia era baja) ahora la frecuencia es de 45 %.

Con respecto a los hongos filamentosos: *P. oxyanthi* no se aisló de hojas jóvenes y su frecuencia es menor en hoja madura y senescente respecto a los censos de agosto y noviembre. *A. alternata* se la aisló de todos los estadios y con frecuencias altas. *Cladosporium* está representado por tres especies *C. cladosporioides*, *C. oxysporum* y *C. sphaerospermum* con frecuencias bajas. En cambio *E. purpurascens* está presente en todos los estadios y con frecuencias altas en hoja joven y madura.

Hormonema dematioides, hongo levaduriforme, es dominante en hoja joven (67,5%)

Con excepción de *N. oryzae* y MDE1, las restantes especies están presentes con frecuencias < 5% y en uno o dos estadios.

En este censo se aislaron 22 especies diferentes, estando representadas 11 en hoja joven, 12 en hoja madura y 16 en hoja senescente. A igual que en el censo de noviembre la mayor variabilidad corresponde a hoja senescente.

Las especies Dematiáceas, predominan tanto en TCFL como TCF. No se aislaron especies Moniliáceas en hoja joven y madura en TCF. En TCFL tenemos colonias Moniliáceas debido al aporte de las levaduras pero con porcentaje mayor en hoja senescente (J:25.4%, M:22.73%, S:42.9%). Por tratarse de un censo de verano tardío, hay mayor irradiación y el porcentaje de Moniliáceas aumenta en las zonas más protegidas o sea

hojas senescentes pero no supera a las Dematiáceas.

Si analizamos la **variabilidad específica** con respecto a la estación (Fig.13) se encuentra el máximo en otoño con 26 especies diferentes y la menor en primavera con 15 especies. Cuando se analiza la variación específica con respecto al estadio de la hoja se ve que el valor máximo se alcanza cuando la hoja está madura (Fig.14). Esto no coincide con lo encontrado por Pandey (1990) en *Psidium guajaba* L. quien obtiene los valores máximos en hoja senil.

Muchos autores (Dickinson, 1967; Gourbière, 1975; Mishra y Das, 1981; Kahlki et al., 1986; Legault et al., 1989) coinciden en que la micoflora aumenta cualitativa y cuantitativamente en las hojas maduras, alcanzando valores máximos en las hojas senescentes; relacionándolo con los cambios a nivel nutricional que se producen en las hojas al envejecer, sobre todo aumenta la lixiviación, alcanzando el máximo en la senescencia (Tukey, 1971). Las sustancias lixiviadas contienen nutrientes, como carbohidratos y aminoácidos, que pueden ser utilizados por los microorganismos (Godfrey, 1976), pero también sustancias que inhiben su crecimiento (Godfrey, 1976; Irvine et al., 1978; Blakeman y Atkinson, 1981). Entre las sustancias lixiviadas de hojas de coníferas, Millar (1974) menciona: K, Ca, Na, P y polifenoles, con propiedades antimicrobianas (Blakeman y Atkinson, 1981). En el caso de *P. taeda* planteamos el

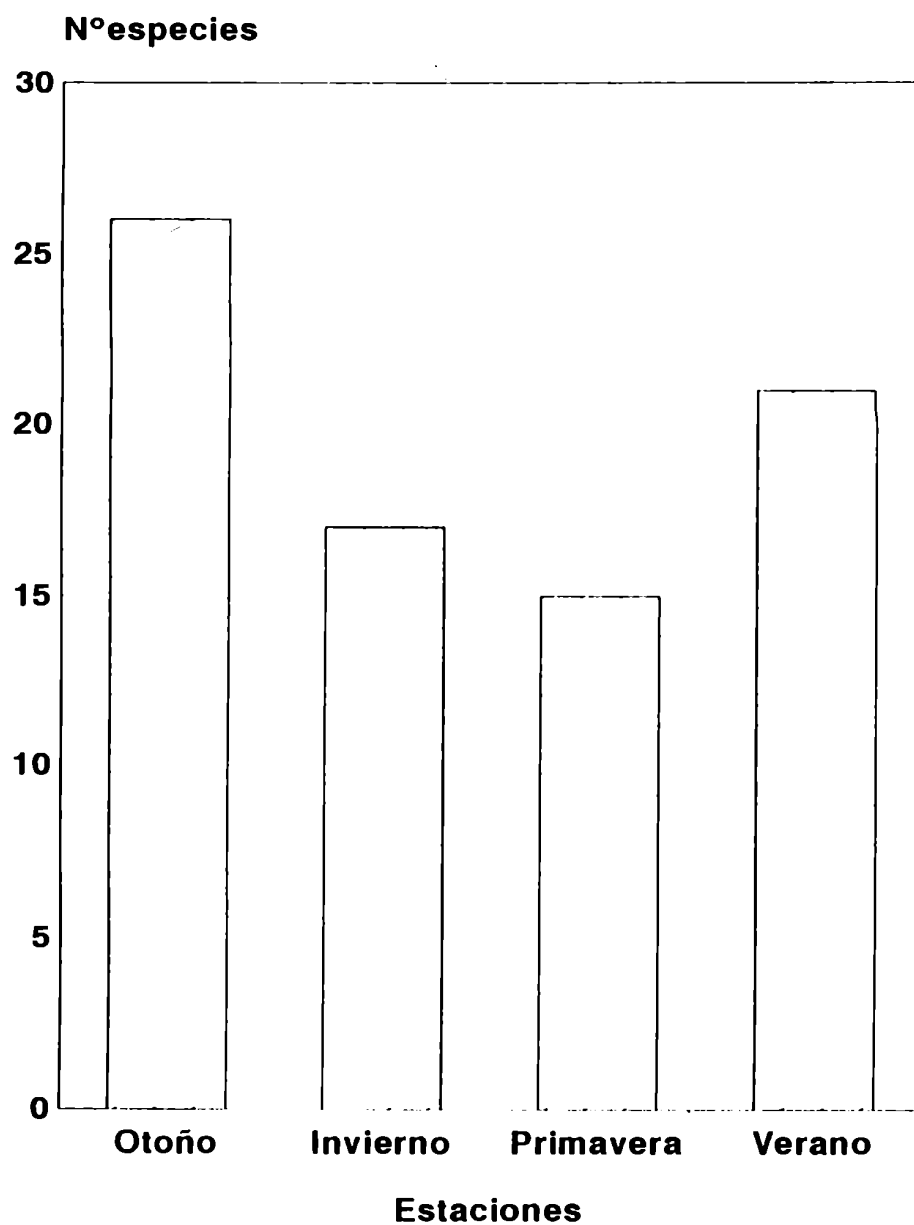


FIGURA 13 : Diversidad específica (número de especies) en la hoja de *Pinus taeda* en las distintas estaciones.

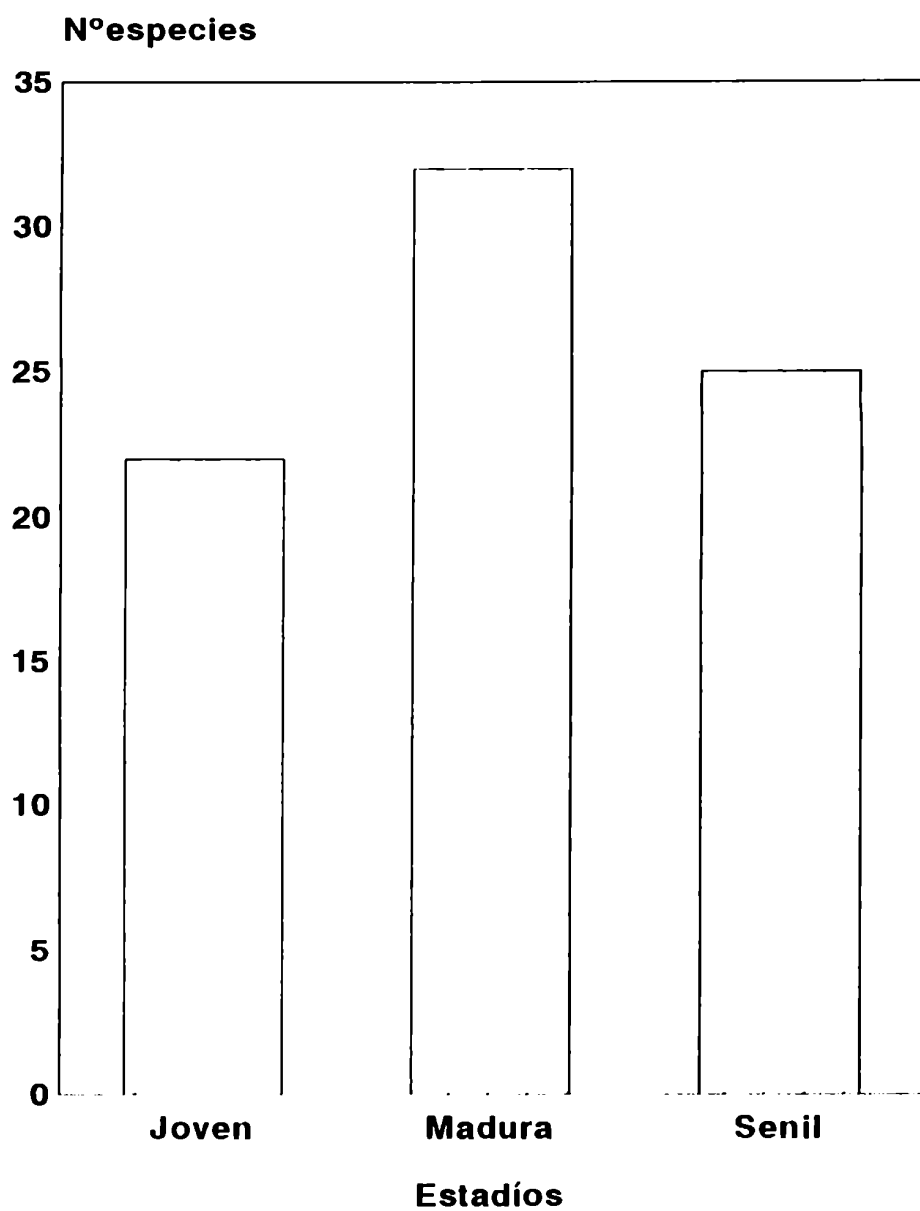


FIGURA 14: Diversidad específica (número de especies) en los diferentes estadíos (joven, madura y senescente) de la hoja de *Pinus taeda*.

interrogante acerca de la existencia de algún compuesto lixiviado en la senescencia que puede tener un efecto negativo sobre la micoflora.

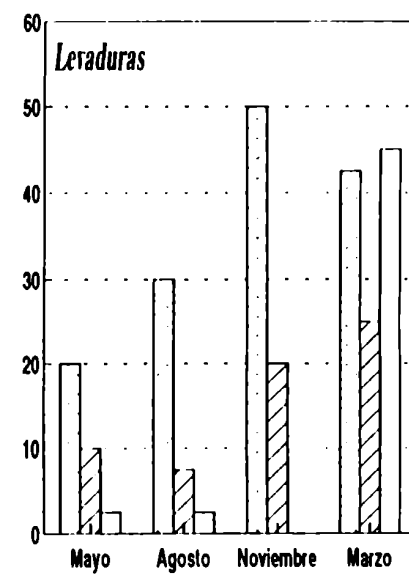
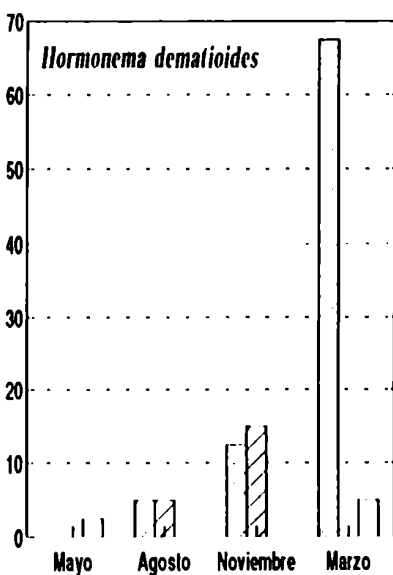
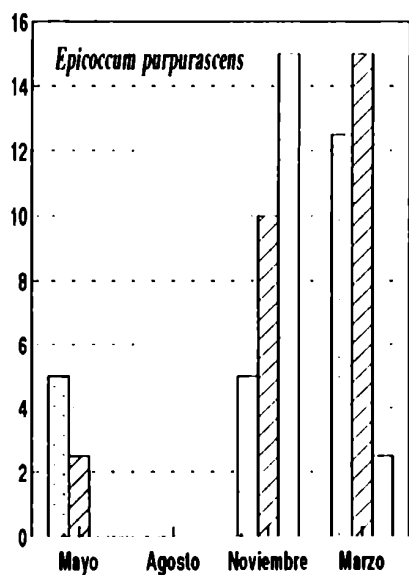
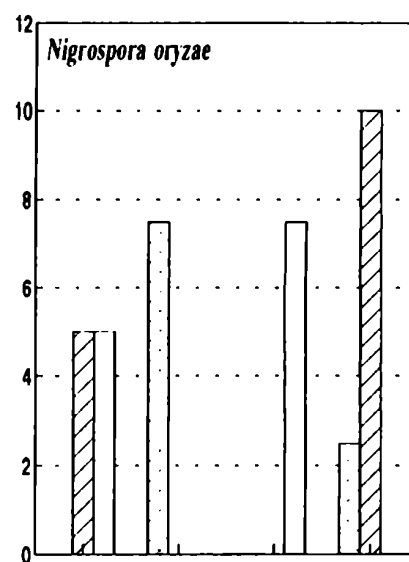
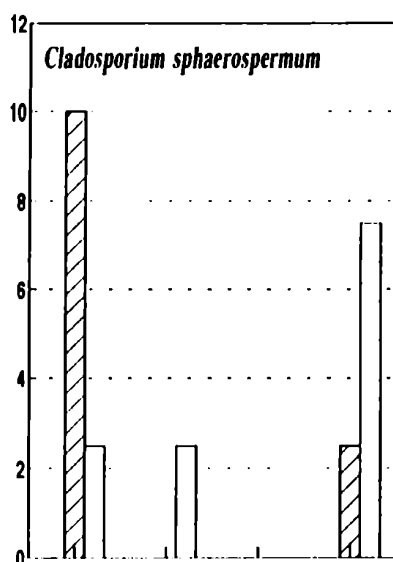
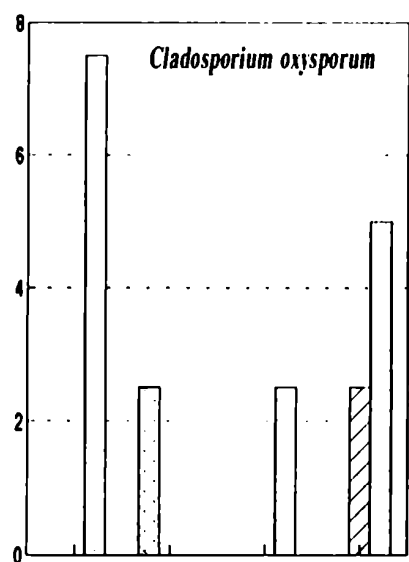
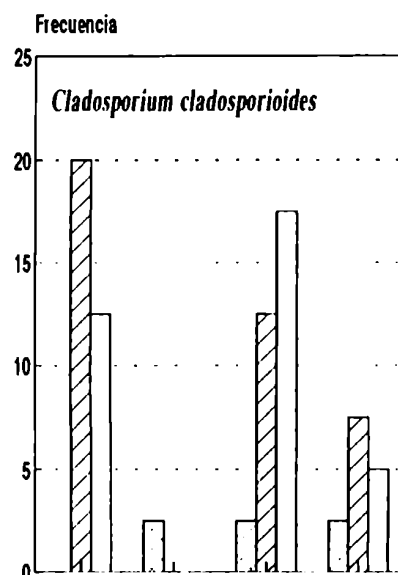
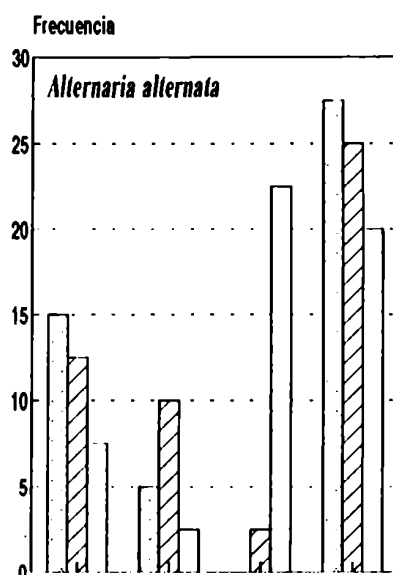
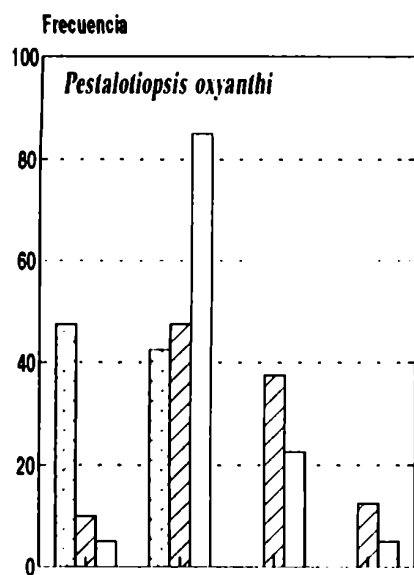
De las 49 especies aisladas (Tabla 11 y Anexo Tabla 11), 9 pueden considerarse de importancia en la filosfera de *Pinus taeda*, por presentar frecuencias mayores en todas o algunas estaciones y/o estadios (Fig.15).

Estas especies son *Pestalotiopsis oxyanthi*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum*, *C. sphaerospermum*, *Nigrospora oryzae*, *Epicocum purpurascens*, *Hormonema dematioides* y el grupo de las levaduras. Con frecuencias menores *Xylohypha curta*, *Penicillium* sp., *Fusarium lateritium*, *Wardomyces* aff. *inflatus*, *Acremonium strictum*, MME5 y MDE1. Los restantes aislamientos tienen una frecuencia menor al 5%.

La composición florística coincide con lo citado por Hudson (1971) para plantas superiores de climas templados, quien menciona *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum nigrum* y *Botrytis cinerea* como colonizadores saprobios primarios comunes que se aíslan de la hoja en la senescencia y penetran los tejidos luego de la caída de la hoja.

En este trabajo se aislaron desde la hoja madura 3 especies del género *Cladosporium*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *C. oxysporum*, y *Nigrospora oryzae*, *A. alternata*, *E. purpurascens* desde la hoja joven. Datos coincidentes con éstos son mencionados por Ruscoe (1971) en

FIGURA 15: Frecuencia (%) de las especies fúngicas más importantes presentes en la filosfera de hoja joven, madura y senescente de *Pinus taeda* aisladas por el método de lavado en las diferentes estaciones del año.



hojas de *Nothofagus truncata*; Lindsey y Pugh (1976) en *Hippophae rhamnoides*. Cabral (1985) aisló *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *N. oryzae* y *E. nigrum* antes de la senescencia de las hojas de *E. viminalis* y Kahlki et al., (1986) encontraron *A. alternata*, *E. purpurascens* y *C. herbarum* durante todo el desarrollo de las acículas de *P. sylvestris*.

Pandey (1990) aisló también *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *E. purpurascens* desde la yema hasta la hoja madura de *Psidium guajava*, confirmando así la actividad vegetativa de estos organismos en la filosfera antes de iniciarse la senescencia. Estas especies son cosmopolitas y se encuentran distribuidas en distintos tipos de hojas.

La presencia de *N. oryzae* en *P. taeda* y *Eucalyptus viminalis* (Cabral, 1985) afirma lo postulado por Hudson (1968, 1971) quien sugiere que en climas con características subtropicales-tropicales las especies de *Alternaria* que son comunes en climas templados son parcialmente reemplazadas por especies de *Nigrospora* y *Curvularia*.

Botrytis cinerea una especie común en el filoplano de plantas superiores de climas templados no fue encontrada en este estudio, coincidiendo con los resultados de Watson et al. (1974), Gourbière (1975), Baker et al. (1979), Mishra y Das (1981) y Cabral (1985).

Aureobasidium pullulans fue citada por Hudson y Webster (1958) en *Agropyron repens*, Ruscoe (1971) en *Nothofagus*

truncata, Lamb y Brown (1970) en *Eucalyptus stellulata*, Pugh y Buckley (1971) en *Acer pseudoplatanus* pero no fue aislada de hoja viva de *P. taeda*, coincidiendo esto con lo citado por Watson et al. (1974) en *P. taeda*, Legault et al. (1989) en *P. banksiana* y Cabral (1985) en *Eucalyptus viminalis*.

Hormonema dematioides se aisló con frecuencias altas en algunos estadíos, Legault et al. (1989 a) la aisla de hoja de *Pinus banksiana* y *P. resinosa* y Sieber-Canavesi y Sieber (1993) de acículas de *Abies alba*. Esta especie es taxonómicamente afín a *Aureobasidium pullulans* lo que llevaría a postular la hipótesis que ambas ocuparían posiblemente el mismo nicho ecológico.

En este trabajo se aisló *Pithomyces chartarum*, especie también encontrada por Ivory (1972) en *Pinus radiata*. Esta especie es común en plantas herbáceas como *Paspalum dilatatum* (Lamb y Brown, 1970); *Glycine max* (Miller y Roy, 1981) siendo descrita en algunos casos como endofita y agente causal de eczema facial del ganado (Menna (1971)).

Phoma pomorum, presente en *Pinus taeda*, también fue aislada del filopiano de *Pinus sylvestris* por Kahlki et al. (1986).

En *P. taeda* aislamos *Leptosphaerulina* aff. *australis*; otra especie del mismo género, *L. trifolii*, fue citada por Ivory (1972) en *Pinus radiata*.

La composición a nivel de género en *P. taeda* es similar a la citada por otros autores (Watson et al., 1974; Mishra y Das, 1981; Kahlki et al., 1986; Legault et al., 1988) para

ésta y otras especies del género *Pinus* en el hemisferio norte, difiriendo en las especies de hongos que la colonizan y las frecuencias de las mismas.

Collins y Hayes (1976) mencionaron como hongos dominantes a *C. herbarum* y *Cephalosporium* sp., entre las levaduras *Torulopsis* sp. y *S. roseus* en *Picea sitchensis*.

En el filoplano de *Larix decidua*, en cambio además de *C. herbarum*, se aislaron *Stemphylium botryosum*, *F. oxysporum*, *Acremonium* spp., *E. purpurascens*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus clavatus* y *B. cinerea* y entre las levaduras *Rhodotorula glutinis*, *S. roseus*, *Cryptococcus* sp. y *Torulopsis* sp. (McBride y Hayes, 1977)

Watson et al. (1974) mencionaron en la superficie foliar de *P. taeda* y *Quercus marilandica*, *Alternaria tenuis*, *C. herbarum*, *E. nigrum*, mientras que como colonizadores internos a *N. sphaerica* y *Pestalotia olivacea*.

Mishra y Das (1981) citaron para el filoplano de *Pinus kesiya*: *Penicillium chrysogenum*, micelio estéril blanco, *S. roseus*, *C. herbarum* y *A. pullulans* en todos los estadios, mientras que en hojas maduras y senescentes *Mucor hiemalis*, *Trichoderma viride* y *Fusarium sporotrichoides*. Como endofitos en todos los estadios: micelio estéril blanco; en hojas maduras: *Stemphylium* sp.; en senescentes y hojarasca: *P. chrysogenum* y *Phoma humicola*.

Kahlki et al. (1986) aislaron *A. pullulans* con mayor frecuencia en el filoplano de *P. sylvestris*. En hojas viejas predominaron: *A. alternata*, *Cytospora pinastri*, *Ceuthospora*

lauri, *E. purpurascens*, *Phoma pomorum* y *Phomopsis* sp.

Legault et al. (1989a) al estudiar *Pinus resinosa* y *P. banksiana* las especies más frecuentes fueron los saprófitos primarios comunes: *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *E. purpurascens* y *Hormonema dematioides*. Encontraron por primera vez en el filoplano de *Pinus*: *Aureobasidium microstictum*, *Penicillium brevicompactum*, *P. spinulosum* y *Pithomyces chartarum*.

Posteriormente Sieber-Canavesi y Sieber (1993) al estudiar la sucesión de las comunidades fúngicas de *Abies alba* citaron como endofitos de hojas vivas a *Exophiala* sp., *Grovesiella abieticola*, *Cryptocline abietina* y *Gloeosporidiella* sp.

Uno de los pocos trabajos realizados en especies del género *Pinus* en el hemisferio sur, en Chile, es el de Bunster Reyes (1981) en hoja viva de *Pinus radiata*. Mencionó como único colonizador interno a *Naemacyclus niveus*. En el filoplano encontró diferencias en los lugares de muestreo; *A. pullulans* y *Cheiriomycella microscopica* son los colonizadores en Placilla; mientras que en Laguna Verde, a *Cheiriomycella microscopica*, se le agrega *Cryptococcus laurentii*, *C. herbarum* y *Pestalotia neglecta*.

Otro trabajo realizado en el hemisferio sur, en Kenia, es el de Ivory (1972) también en *Pinus radiata*; se citan en la filosfera *A. pullulans*, *Pestalotiopsis monochaetioides*, *Truncatella hartigii*, *Alternaria tenuissima*, *Aureobasidium* sp., *Cladosporium tenuissimum*, *Coniothyrium* spp., *Coremiella*

cubispora, *E. nigrum*, *N. sphaerica*, *Rhodotorula glutinis* y *Slerophoma pythiophila*.

En la Fig.15 se observa que no existe estacionalidad marcada en la distribución de las especies excepto en *P. oxyanthi* y *E. purpurascens*. *P. oxyanthi* tiene frecuencias mayores en los meses invernales. Esto coincide con lo citado por Godeas (1982) en hojarasca de *P. taeda*. Pandey (1990) también encuentra frecuencias mayores en una especie afín, *Pestalotia psidii*. Este comportamiento es atribuido a que este hongo puede actuar como epífito o endofito, característica que le confiere ventajas sobre otras especies del filoplano más susceptibles a las condiciones climáticas adversas.

En cambio *Epicoccum purpurascens* no se encuentra presente en invierno en ninguno de los estadios de la hoja. También Pugh y Buckley (1971) obtienen frecuencias altas a partir del verano para otra especie, *E. nigrum* en *Acer pseudoplatanus*.

Cladosporium cladosporioides alcanza su mayor valor de frecuencia en otoño, esto coincide con lo encontrado en *Picea abies* por Collins y Hayes (1976) y Gourbière (1975) en *Abies alba*. *C. oxysporum* y *C. sphaerospermum* presentan máximos en verano y otoño como lo encontraron Melgarejo et al. (1985) en ramas de duraznero, mientras que Pugh y Buckley (1971) obtuvieron frecuencias altas de *C. herbarum* a partir del verano.

Hormonema dematioides predomina en verano y primavera.

Alternaria alternata aparece con mayor frecuencia que *Nigrospora oryzae* pero ambas están presentes en todas las estaciones.

Las "levaduras" también se encuentran en el filopiano durante todo el año. Datos similares obtienen Pennycook y Newhook (1981) en *Malus sylvestris*. McBride y Hayes (1977), al estudiar el filopiano de *Larix decidua*, indican que estos organismos se desarrollan independientemente de la variación de los factores climáticos del lugar.

Del análisis de la distribución de las especies a lo largo del año surge que: la mayoría de ellas se aíslan con mayor frecuencia en los meses templados y cálidos, excepto *P. oxyanthi*.

Si consideramos las poblaciones fúngicas en relación a los distintos estadios de madurez de las hojas vemos que las distintas especies de *Cladosporium* tienen frecuencias menores o están ausentes en las hojas jóvenes, aumentando en hojas maduras y senescentes. Resultados similares obtuvieron Gourbière (1975) en *Abies alba* y Wildman y Parkinson (1979) en *Populus tremuloides*. En cambio Kahlki et al. (1986) las aislaron con la misma frecuencia tanto de hojas jóvenes como maduras de *Pinus sylvestris*. Mishra y Das (1981) obtuvieron frecuencias mayores en hojas jóvenes de *Pinus kesiya* decreciendo con la edad hasta un mínimo en la hojarasca. McBride y Hayes (1977) indicaron que la edad de las hojas de *Larix decidua* era el factor más importante para determinar el patrón de desarrollo de hongos filamentosos, levaduras y

bacterias.

Las levaduras predominaron en hojas jóvenes durante la mayor parte del año salvo en verano que tienen frecuencias altas en todos los estadios. Hogg y Hudson (1966) citaron varias especies de levaduras (*Sporobolomyces roseus*, *Bullera alba*, *Tilletiopsis minor*, *Itersonilia perplexas*) desde la hoja recién desplegada de *Fagus sylvatica*. Bernstein y Carroll (1977) mencionaron colonias hialinas de organismos levaduriformes en las hojas de un año de *Pseudotsuga menziesii* que decrecieron en abundancia con la edad de las hojas.

McBride y Hayes (1976) aislaron levaduras desde el primer mes de vida de las hojas de *Larix decidua* y Mishra y Dickinson (1984) mencionaron que *S. roseus* tiene mayor actividad en hojas jóvenes y maduras de *Ilex aquifolium*, pero no se lo aisló de hojarasca.

Pandey (1990) sólo aisló levaduras de hojas jóvenes y yemas de *Psidium guajava*, en cambio Last (1955) cita frecuencias mayores de *Sporobolomyces* sp. en hojas senescentes y muertas de cereales. También Mishra y Dickinson (1981) encontraron que las hojas maduras y senescentes de *Ilex aquifolium* tienen más poblaciones de levaduras que las hojas jóvenes.

La levadura negra, *Hormonema dematioides*, es importante en hoja joven en este estudio, en cambio Sieber-Canavesi y Sieber (1993) la aislaron con mayor frecuencia de hojas parcial o totalmente amarillentas de *Abies alba*.

Si bien la metodología aplicada en este estudio no discrimina entre organismos endofilos y del filoplano, algunas especies afines a las aisladas en este trabajo fueron citadas por otros autores como endofitos. Como *Pestalotia funerea* (Ruscoe, 1971); *Pestalotiopsis* sp. y *Alternaria* sp. (Norse, 1972); *Cladosporium* sp. (Carroll y Carroll, 1978); *Nigrospora sphaerica* y *Pestalotia olivacea* (Watson et al., 1974); *A. pullulans*, *C. herbarum* y *E. purpurascens* (Lindsey y Pugh, 1976); *Alternaria alternata* (Mishra y Das, 1981; Miller y Roy, 1981); *Ch. globosum*, *E. purpurascens*, *Fusarium semitectum*, *Nigrospora* sp., *Paecilomyces* sp., *Pestalotia* sp., *Pithomyces chartarum* y *C. herbarum* (Miller y Roy, 1981); *Alternaria* sp., *P. oxyanthi*, *Chaetomium* sp., *Hormonema* sp. (Bertoni y Cabral, 1988); *Hormonema dematioides*, (Sieber Canavesi y Sieber, 1993). De acuerdo a esto posiblemente *P. oxyanthi*, *H. dematioides*, *N. oryzae*, *A. alternata*, *E. purpurascens*, *Ch. globosum*, *Paecilomyces* sp., *P. chartarum* y *Cladosporium* spp. colonicen internamente las hojas de *P. taeda*.

6.B.7 SECUENCIA DE COLONIZACION

Estudiando la composición de la micoflora en hoja joven de *P. taeda*, podemos establecer la secuencia de colonización.

Al final del invierno (agosto) se observó en el ápice de las ramas la presencia de hojas de 1 cm de longitud debido al desarrollo de los primordios foliares de la yema apical. En

el mes de noviembre esta hoja se había desarrollado y se determinó que los primeros colonizadores de la hoja son los epifitos no patógenos, habitantes del filoplano (Dickinson, 1976) como *Hormonema dematioides*, especie de hifomicete muy relacionada con las levaduras (Hoog et al., 1977) y varias especies de levaduras, acompañados por otras de menor importancia como *E. purpurascens*, *C. cladosporioides*, *X. curta* y *Drechslera bicolor* que aparecen esporádicamente.

En el muestreo de marzo se incorporan los epifitos no patógenos, invasores del filoplano (Dickinson, 1976) como *A. alternata* con frecuencia alta; *E. purpurascens* y *Hormonema dematioides* aumentan su importancia, manteniendo las levaduras su frecuencia. Como especies acompañantes de menor importancia se aíslan *C. cladosporioides*, *N. oryzae*, *W. inflatus*, *P. chartarum*, *P. pomorum* y *Ch. globosum*.

En mayo aparece *P. oxyanthi* con frecuencia alta. Esta especie se mantiene presente a lo largo de la vida de la hoja. Baja la frecuencia de *A. alternata*, *E. purpurascens* y las levaduras y como especies acompañantes nuevas tenemos a *Leptosphaerulina aff. australis*, *F. sulphureum*, *X. curta* y IND 71.

En agosto *P. oxyanthi* se mantiene con valores altos y las levaduras bajan su frecuencia de aparición; siendo *C. oxysporum*, *Penicillium sp.*, IND 268, MME3, MDE4 especies acompañantes.

En la hoja madura de noviembre (1 año de edad) *P. oxyanthi* mantiene su frecuencia alta y *C. cladosporioides* la aumenta.

Al cabo de un año *H. dematioides* y las levaduras hialinas son reemplazadas por las especies filamentosas.

Algunas de las especies aisladas de la filosfera de *P. taeda* como *P. oxyanthi*, *A. alternata*, *E. purpurascens*, *F. lateritium*, *F. oxysporum* se mantienen como población en la hojarasca (Godeas, 1982).

6.B.8 ANALISIS DE LAS COMUNIDADES FUNGICAS.

6.B.8.1 EN HOJAS EN DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ

EN OTONO

En el análisis de componentes principales (ACP) para otoño (mes de mayo) los primeros 4 componentes derivados del análisis efectuado sobre la matriz de frecuencias fúngicas (20 especies x 30 muestras) explicaron el 42,97 % de la variación entre las muestras en relación a las especies presentes y sus valores de frecuencia. Las contribuciones de las especies pueden observarse en la Tabla 13.

El componente uno (I) muestra la segregación de 8 muestras (6 Jóvenes y 2 maduras); estas muestras están localizadas sobre el sector positivo del componente y se hallan caracterizadas por la alta frecuencia de *Fusarium lateritium* y de las levaduras. Estas especies son poco frecuentes o están ausentes en el resto de las muestras correspondientes a hojas jóvenes y maduras, así como en las seniles. Las muestras mencionadas están localizadas tanto en el sector negativo del componente como en el sector positivo pero valores cercanos a cero; además dichas muestras se caracterizan por la mayor frecuencia de *Alternaria alternata* y *Cladosporium oxysporum*.

El componente dos (II) muestra la segregación de 5 muestras correspondientes a hojas seniles (3) y jóvenes (2) las cuales están caracterizadas por la presencia de *Hormonema dematioides*, *Xylohypha curta* y *Cladosporium oxysporum*; las

ESPECIES FUNGICAS	C1	C2	C3	C4
X(2) PEST	0.349	0.056	0.700	-0.208
X(3) ALTE	-0.439	-0.382	0.530	-0.086
X(4) CLCL	-0.274	0.165	-0.496	0.139
X(5) CLOX	-0.380	0.627	0.088	0.225
X(6) CLSP	-0.319	-0.453	-0.426	-0.281
X(7) XYLO	0.237	0.706	-0.161	-0.215
X(8) NIGR	-0.101	-0.058	-0.489	-0.181
X(9) FULA	0.774	0.017	0.038	-0.034
X(10) EPIC	0.270	0.102	0.131	-0.089
X(11) PENI	0.004	-0.104	0.366	-0.044
X(12) HORM	-0.205	0.777	-0.157	-0.094
X(14) MME5	-0.171	0.013	-0.100	-0.070
X(16) LEVA	0.706	-0.043	0.192	-0.150
X(17) FUSU	0.562	-0.096	-0.058	0.054
X(18) LEPT	-0.204	-0.050	0.444	-0.053
X(19) MICR	-0.250	-0.326	-0.275	-0.194
X(20) FUOX	-0.015	-0.051	-0.125	0.033
X(21) WARD	-0.166	0.040	-0.010	0.904
X(22) EURO	0.025	-0.074	-0.189	0.850
X(23) PAEC	0.079	-0.028	0.018	-0.059
AUTOVALOR	2.398	2.031	2.022	1.916
% VAR.EX.	14.46	10.73	8.91	8.87

TABLA 13.- Contribuciones de las especies fúngicas a los primeros 4 componentes (C1-C4) derivados del análisis de componentes principales efectuado para el mes de mayo.

muestras mencionadas están localizadas sobre el sector positivo del componente. En el extremo negativo se localizan las muestras correspondientes a hojas maduras y el resto de las seniles y maduras, las cuales están caracterizadas por la presencia de *Cladosporium sphaerospermum* y *A. alternata*.

El componente tres (III) muestra la segregación de muestras donde *Pestalotiopsis oxanthi* y *A. alternata* son especies dominantes, de las muestras donde tienen mayor frecuencia *C. cladosporioides*, *Nigrospora oryzae* y *C. sphaerospermum*. Las primeras están ubicadas sobre el sector positivo del componente mientras que las segundas se encuentran en el sector negativo. La segregación observada no está asociada con la edad de la hoja; las muestras correspondientes a hojas jóvenes, maduras o senescentes se encuentran localizadas tanto en el sector positivo como negativo del componente.

El componente cuatro (IV) muestra la segregación de 2 muestras correspondientes a hojas maduras (1) y seniles (1); ambas muestras están ubicadas en el extremo positivo del componente y se caracterizan por la dominancia de *Wardomyces aff. inflatus* y *Eurotium rubrum*. Estas especies son poco frecuentes y están ausentes en el resto de las muestras que se encuentran ubicadas en el sector negativo o en el sector positivo pero con valores muy bajos.

La combinación de los componentes uno (I) y tres (III) muestra una clara segregación de las muestras correspondientes a hojas jóvenes y seniles (Fig. 16); ningún

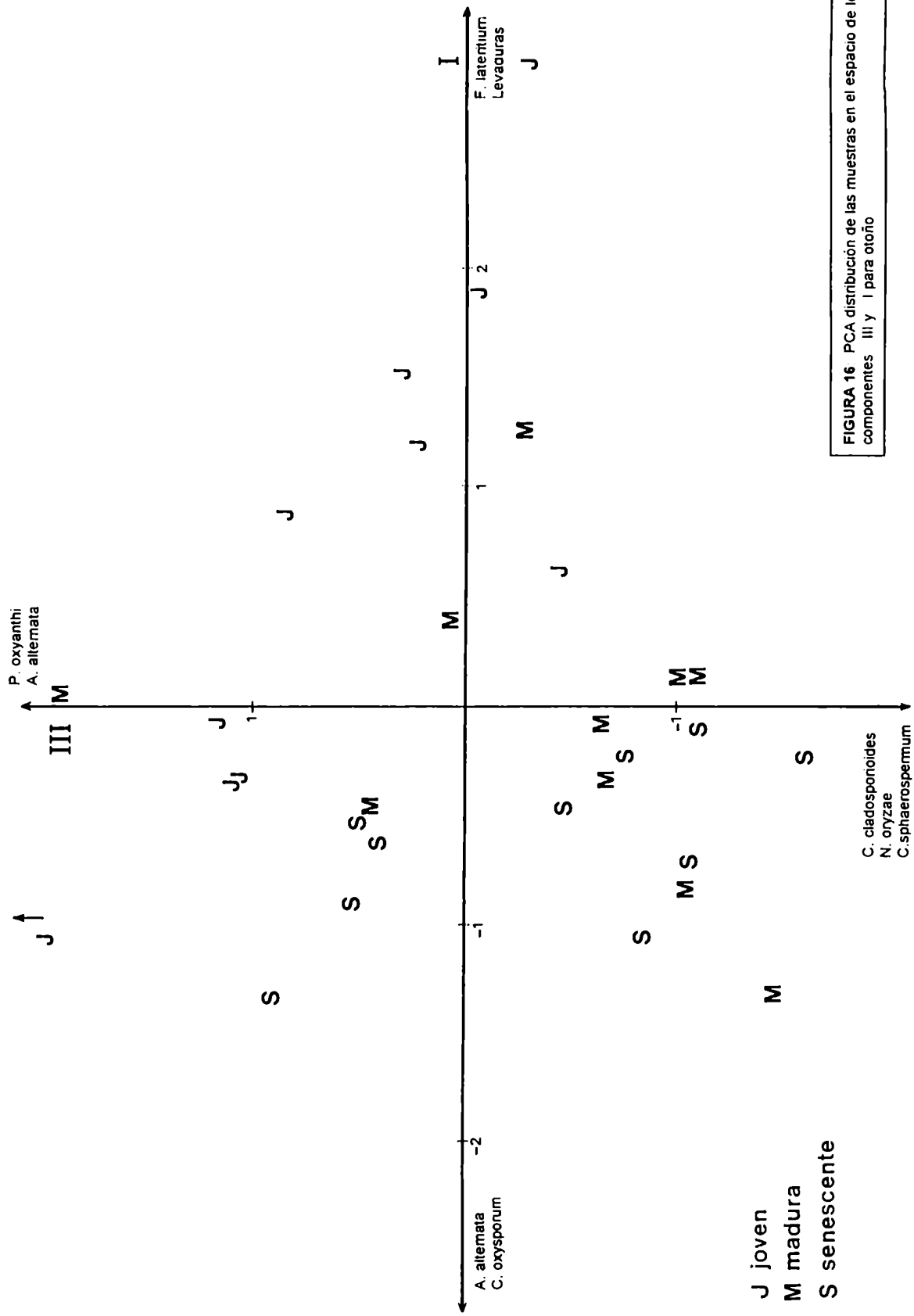


FIGURA 16 PCA distribución de las muestras en el espacio de los componentes III y I para otoño

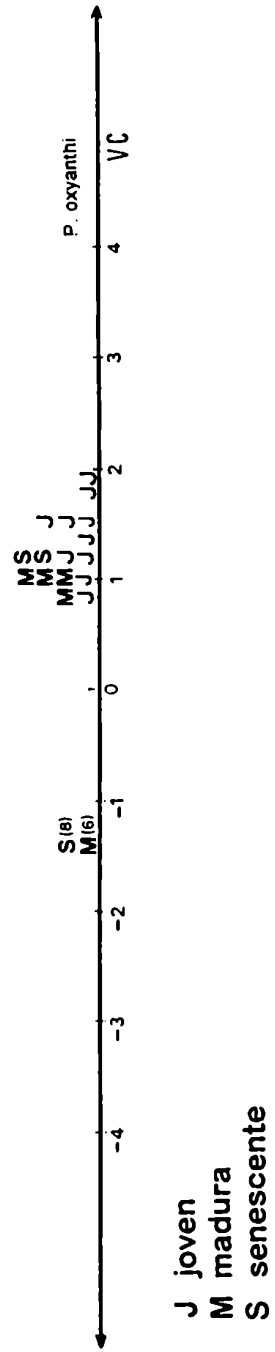
componente reflejó claramente la segregación de muestras correspondientes a las hojas maduras.

Las censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento la edad de la hoja. El análisis discriminante dio como resultado una sola función (VC_1), la cual explicó el 100% de la varianza total. Dicha función estuvo asociada con *P. oxyanthi*; la distribución de las muestras en relación a dicha función indica que las muestras correspondientes a hojas jóvenes se encuentran ubicadas sobre los valores positivos de la función, mientras que las muestras correspondientes a hojas seniles se encuentran sobre los valores negativos (Fig.17). La clasificación general obtenida del análisis discriminante indica que el 60% de las muestras fueron clasificadas correctamente (Tabla 14). El bajo porcentaje de clasificación se debió a que las muestras de hojas maduras fueron asignadas a otros estadios de acuerdo con los valores de frecuencia de *P. oxyanthi*. Las muestras de hojas maduras con alta frecuencia de *P. oxyanthi* fueron asignadas al estadio juvenil, mientras que las muestras donde la frecuencia de dicha especie fue baja o estuvo ausente fueron asignadas al estadio senescente.

EN INVIERNO

En el análisis de componentes principales (ACP) para invierno (mes de agosto) los primeros 3 componentes derivados del análisis efectuado sobre la matriz de frecuencias (11

FIGURA 17: Analisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de la variable canónica



Grupo	% clasificación correcta.	Joven	Madura	Senescente
Madura	0	4	0	6
Joven	100	10	0	0
Senescente	80	2	0	8
Total	60	16	0	14

TABLA 14.- Clasificación del **análisis discriminante** basado en los datos fúngicos del mes de **mayo** usando el estado de madurez de las hojas como variable discriminante.

especies X 30 muestras) explicaron el 43,16 % de la variación entre las muestras en relación a las especies presentes y sus valores de frecuencia. Las contribuciones de las especies pueden observarse en la Tabla 15.

Sobre el sector positivo del componente uno (I) se encuentran las muestras (4 maduras, 2 jóvenes y 1 senil) donde las especies dominantes son *Acremonium strictum* y *Alternaria alternata*, que son poco frecuentes o están ausentes en el resto de las muestras, las cuales están ubicadas en el sector negativo del componente.

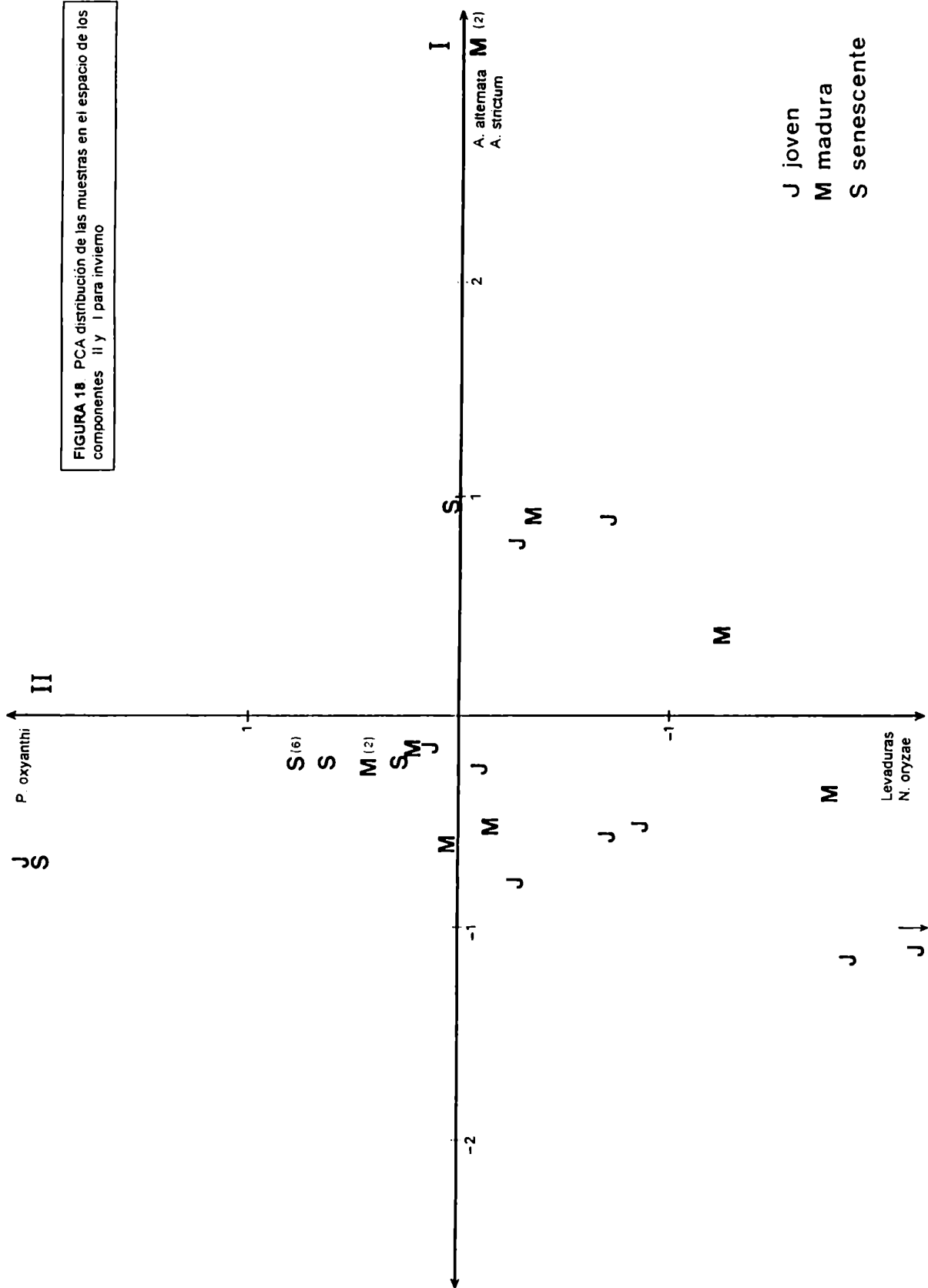
Sobre el sector positivo del componente dos (II) se encuentran las muestras (4 maduras, 2 jóvenes y 10 seniles) donde la especie dominante es *Pestalotiopsis oxanthi*, mientras que sobre el sector negativo se localizan los censos dominados por *Nigrospora oryzae* y las levaduras (8 jóvenes y 6 maduras).

Sobre el sector positivo del componente tres (III) se encuentran las muestras (5 jóvenes, 4 maduras y 1 senil) dominadas por *Penicillium* sp. y las levaduras; en el sector negativo del componente se localizan el resto de las muestras, caracterizadas por la presencia de *Nigrospora oryzae*. El componente dos (II) permitió diferenciar las hojas juveniles de las seniles. La segregación de los distintos tipos de hojas fue analizada mediante análisis discriminante (AD) utilizando como variable de agrupamiento la edad de las mismas. El análisis discriminante dio como resultado una función (VC₁), la cual explicó el 100% de la varianza total,

ESPECIES FUNGICAS	C1	C2	C3	C4
X(2) PEST	0.053	0.720	-0.024	-0.135
X(3) ALTE	0.831	-0.212	-0.062	0.006
X(4) CLCL	-0.137	0.399	-0.127	-0.016
X(5) CLOX	-0.108	-0.137	-0.044	0.883
X(6) CLSP	-0.137	0.399	-0.127	-0.016
X(7) XYLO	-0.064	-0.204	-0.137	-0.123
X(8) NIGR	-0.303	-0.546	-0.407	-0.279
X(11) PENI	-0.090	-0.090	0.809	-0.114
X(12) HORM	-0.271	-0.299	0.427	-0.354
X(13) ACRE	0.843	-0.013	-0.112	-0.115
X(16) LEVA	-0.092	-0.368	0.606	0.398
AUTOVALOR	1.640	1.474	1.440	1.202
% VAR.EX.	18.49	13.85	10.82	10.36

TABLA 15.- Contribución de las especies fúngicas a los primeros 4 componentes (C1-C4) derivados del **análisis de componentes principales** efectuado para el mes de **agosto**.

FIGURA 18 PCA distribución de las muestras en el espacio de los componentes II y I para invierno



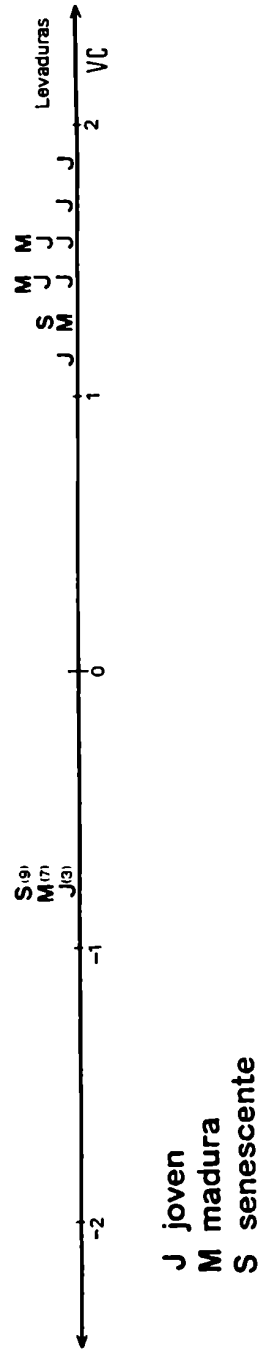
esta función estuvo asociada con las levaduras. La distribución de las muestras en relación a la función extraída indica que las muestras correspondientes a hojas jóvenes se encuentran ubicadas sobre los valores positivos de la función, mientras que las muestras correspondientes a hojas seniles y maduras se encuentran sobre los valores negativos (Fig.19). La clasificación general obtenida del AD indica que el 53,3 % de las muestras fueron clasificadas correctamente (Tabla 16). El porcentaje de clasificación de las hojas maduras fue cero; ellas fueron asignadas a jóvenes o seniles dependiendo de la dominancia de las levaduras.

EN PRIMAVERA

En el análisis de componentes principales (PCA) de primavera (mes de noviembre), los primeros 3 componentes derivados del análisis efectuado sobre la matriz de frecuencias fúngicas (11 especies X 30 muestras) explicaron el 54,16% de la variación entre las muestras en relación a las especies presentes y sus valores de frecuencia. Las contribuciones de las especies pueden observarse en la Tabla 17.

En el sector positivo del componente uno (I), están ubicadas las muestras correspondientes a hojas seniles (Fig.20) caracterizadas por la dominancia de las especies *A. alternata* y *Epicoccum purpurascens*. Las muestras correspondientes a hojas juveniles y maduras se encuentran situadas en el sector negativo de componente uno. Estas

FIGURA 19: Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de la variable canónica

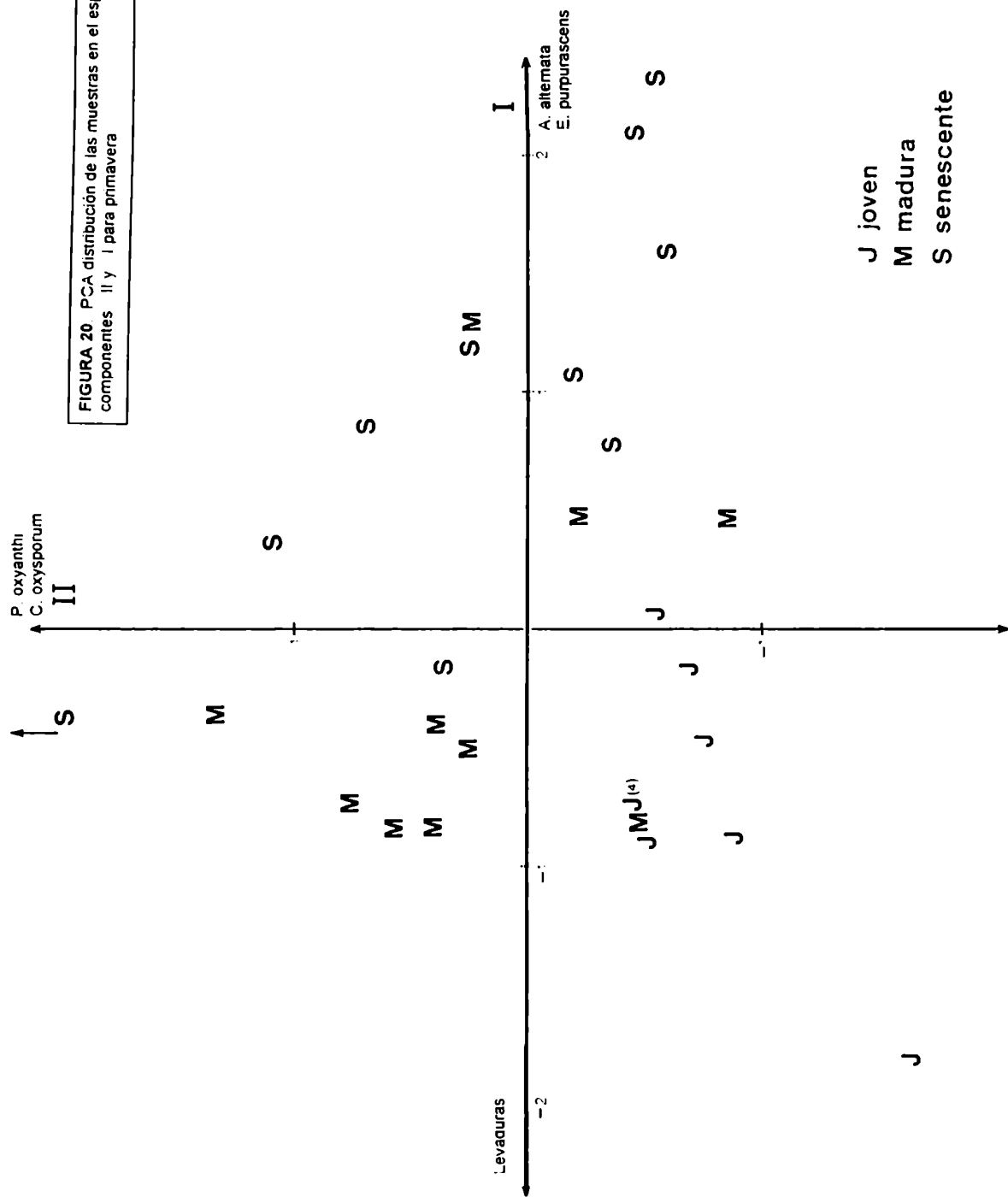


Grupo	% clasificación correcta.	Joven	Madura	Senescente
Joven	70	7	0	3
Madura	0	3	0	7
Senescente	90	1	0	9
Total	53.3	11	0	19

TABLA 16.- Clasificación del **análisis discriminante** basado en los datos fúngicos del mes de **agosto** usando el estado de madurez de las hojas como variable discriminante.

ESPECIES FUNGICAS	C1	C2	C3	C4
X(2) PEST	-0.073	0.772	0.344	-0.037
X(3) ALTE	0.813	-0.056	0.370	-0.139
X(4) CLCL	0.584	-0.160	0.459	-0.052
X(5) CLOX	-0.075	0.747	-0.239	-0.106
X(7) XYLO	-0.169	-0.170	-0.007	0.576
X(8) NIGR	0.551	0.001	-0.187	-0.111
X(10) EPIC	0.770	-0.214	-0.209	0.004
X(11) PENI	-0.038	0.075	0.874	-0.037
X(12) HORM	-0.369	-0.185	-0.139	0.672
X(16) LEVA	-0.760	-0.446	-0.224	0.097
X(24) DREC	-0.340	-0.316	-0.058	-0.692
AUTOVALOR	2.767	1.597	1.440	1.319
% VAR.EX.	27.89	15.24	11.03	10.59

TABLA 17.- Contribuciones de las especies fúngicas a los primeros 4 componentes (C1-C4) derivados del análisis de componentes principales efectuado para el mes de noviembre.



muestras están caracterizadas por la dominancia de levaduras.

El componente dos (II), muestra la segregación de 3 muestras, 2 correspondientes a hojas seniles y 1 a hoja madura; que están localizadas sobre el sector positivo del componente. Las muestras mencionadas están caracterizadas por la presencia de *P. oxyanthi* y *C. oxysporum*. Estas especies son menos frecuentes o están ausentes en las muestras localizadas en el extremo negativo del componente en el cual se localizan la totalidad de las muestras correspondientes a hojas jóvenes. En este extremo, las muestras correspondientes a hojas maduras y seniles son poco frecuentes.

El componente tres (III), muestra la segregación de 1 censo correspondiente a hoja senil donde la especie dominante es *Penicillium* sp.; se localiza en el extremo positivo del componente; el resto de las muestras, ubicadas sobre valores negativos del componente o positivos bajos, se caracterizan por la baja frecuencia de *Penicillium* sp.

La combinación de los componentes uno (I) y dos (II) muestra la segregación de las hojas según la edad (Fig.20).

El agrupamiento obtenido en el ACP fue analizado mediante análisis discriminante (AD), utilizando como variable de agrupamiento la edad de la hoja. El análisis discriminante dio como resultado dos funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. La primera función (VC_1), estuvo asociada con la frecuencia de las levaduras, mientras que la segunda (VC_2), con la frecuencia de *P. oxyanthi*(-). La distribución de las muestras en relación a las 2 funciones

puede ser observada en la Fig.21. Las muestras correspondientes a hojas jóvenes y maduras se encuentran sobre los valores positivos de la función 1, mientras que las correspondientes a las hojas seniles se encuentran sobre los valores negativos. La función 2 permite discriminar las hojas juveniles de las maduras, las primeras se encuentran localizadas en el sector positivo de la función y las segundas sobre los valores negativos. La clasificación general obtenida del análisis discriminante indica que el 83,3% de las muestras fueron clasificadas correctamente (Tabla 18). El menor porcentaje de clasificación correcto se observó en las hojas maduras, de las cuales el 50% fue clasificado como senil o juvenil dependiendo de la frecuencia de las levaduras.

EN VERANO

En el mes de marzo los primeros 3 componentes derivados del análisis de componentes principales (PCA), efectuado sobre la matriz de frecuencias (15 especies X 30 muestras) explicaron el 40,36 % de la variación entre las muestras, en relación a las especies presentes y sus valores de frecuencia. Las contribuciones de las especies pueden observarse en la Tabla 19.

Sobre el sector positivo del componente uno (I) se encuentran las muestras (6 maduras, 4 jóvenes y 5 seniles) caracterizadas por *Alternaria alternata* y *Pithomyces chartarum*, mientras que el resto de las muestras están

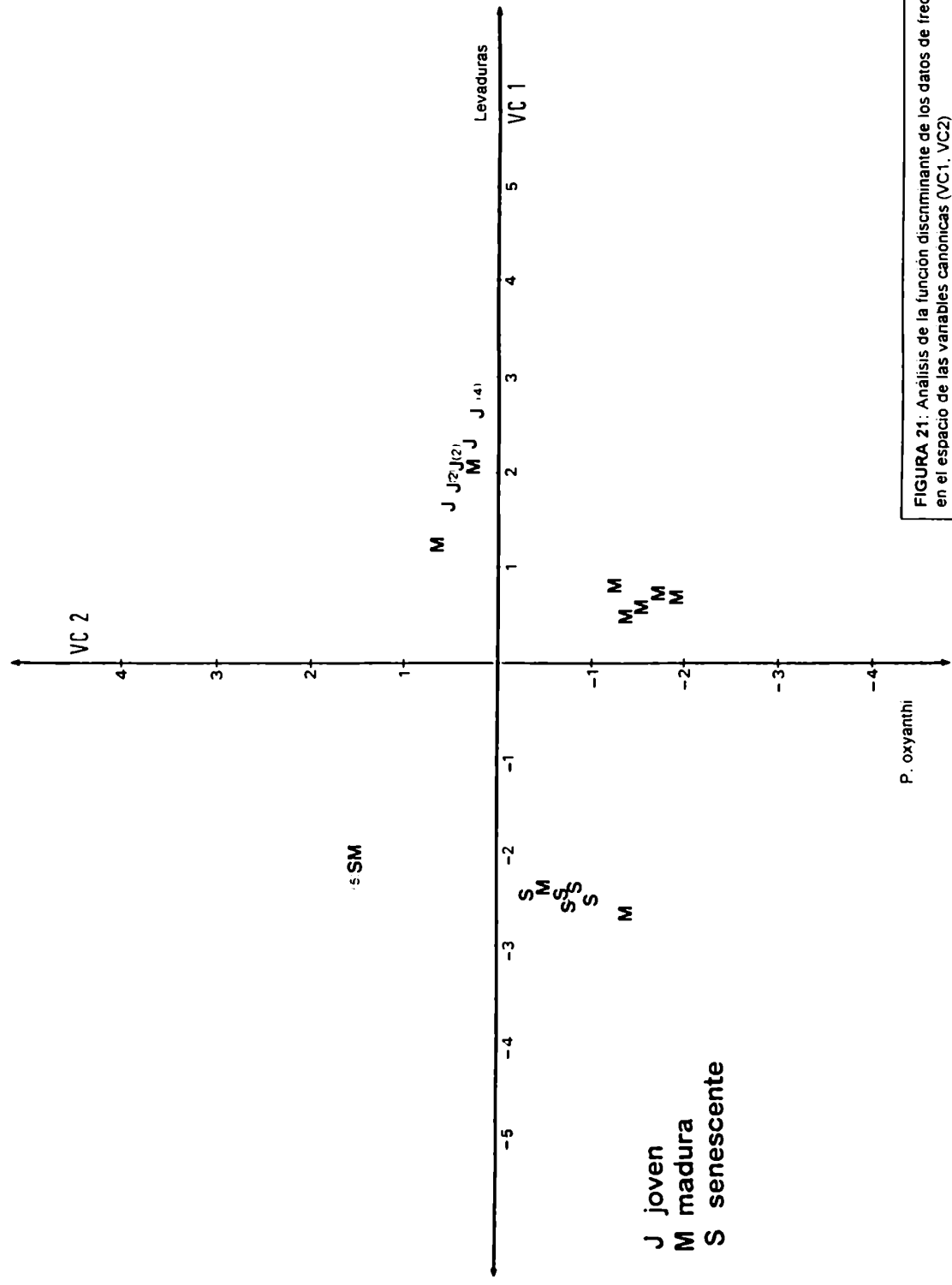


FIGURA 21: Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

Grupo	% clasificación correcta.	Joven	Madura	Senescente
Joven	100	10	0	0
Madura	50	2	5	3
Senescente	100	0	0	10
Total	83.3	12	5	13

TABLA 18.- Clasificación del **análisis discriminante** basado en los datos fúngicos del mes de **noviembre** usando el estado de madurez de las hojas como variable discriminante.

ESPECIES FUNGICAS	C1	C2	C3	C4
X(2) PEST	-0.101	0.043	0.740	-0.125
X(3) ALTE	0.727	0.183	-0.013	0.295
X(4) CLCL	-0.221	-0.181	0.049	0.752
X(5) CLOX	0.143	0.705	0.178	0.019
X(6) CLSP	-0.262	0.675	0.118	-0.153
X(7) XYLO	-0.184	-0.190	-0.135	-0.321
X(8) NIGR	0.237	-0.336	0.521	-0.157
X(10) EPIC	-0.044	-0.158	0.242	-0.322
X(12) HORM	-0.130	-0.367	-0.737	-0.353
X(15) MDE1	-0.130	0.026	0.200	0.013
X(16) LEVA	-0.737	0.188	-0.101	0.282
X(21) WARD	-0.101	0.680	-0.270	-0.169
X(25) PITH	0.608	-0.216	0.102	-0.218
X(27) PHOM	0.006	-0.087	-0.061	0.695
X(28) CHAE	0.466	0.011	-0.398	-0.021
AUTOVALOR	1.941	1.882	1.783	1.688
% VAR.EX.	15.97	12.91	11.48	10.64

TABLA 19.- Contribuciones de las especies fúngicas a los primeros 4 componentes (C1-C4) derivados del análisis de componentes principales efectuado para el mes de marzo.

ubicadas en el sector negativo del componente o en el sector positivo pero en posiciones cercanas al origen; estos censos se caracterizan por presentar una alta frecuencia de las levaduras.

Sobre el sector positivo del componente dos (II) se encuentran las muestras (2 maduras, 1 joven y 5 seniles) donde *Cladosporium oxysporum*, *C. sphaerospermum* y *Wardomyces aff. inflatus* son las especies dominantes. Estas son poco frecuentes o están ausentes en las muestras ubicadas en el sector negativo del componente o en el sector positivo pero con valores cercanos al origen.

Sobre el sector positivo del componente tres (III) se encuentran las muestras (8 maduras y 4 seniles) dominadas por *Pestalotiopsis oxyanthi*. En el sector negativo del componente o en el sector positivo cercano al origen se ubican el resto, caracterizadas por la presencia de *Hormonema dematioides*.

La combinación de los componentes tres (III) y cuatro (IV); tres (III) y cinco (V) indican una clara segregación de los censos correspondientes a hojas jóvenes, maduras y seniles (Fig.22 y Fig.23). Dicha segregación fue analizada mediante análisis discriminante (AD), utilizando como variable de agrupamiento la edad de la hoja. Este análisis dio como resultado dos funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total; la primera función estuvo asociada con *Hormonema dematioides* y *Xylohypha curta*(-) y la segunda con *X. curta*(-). La distribución de las muestras en relación a dichas funciones indica que las muestras correspondientes a

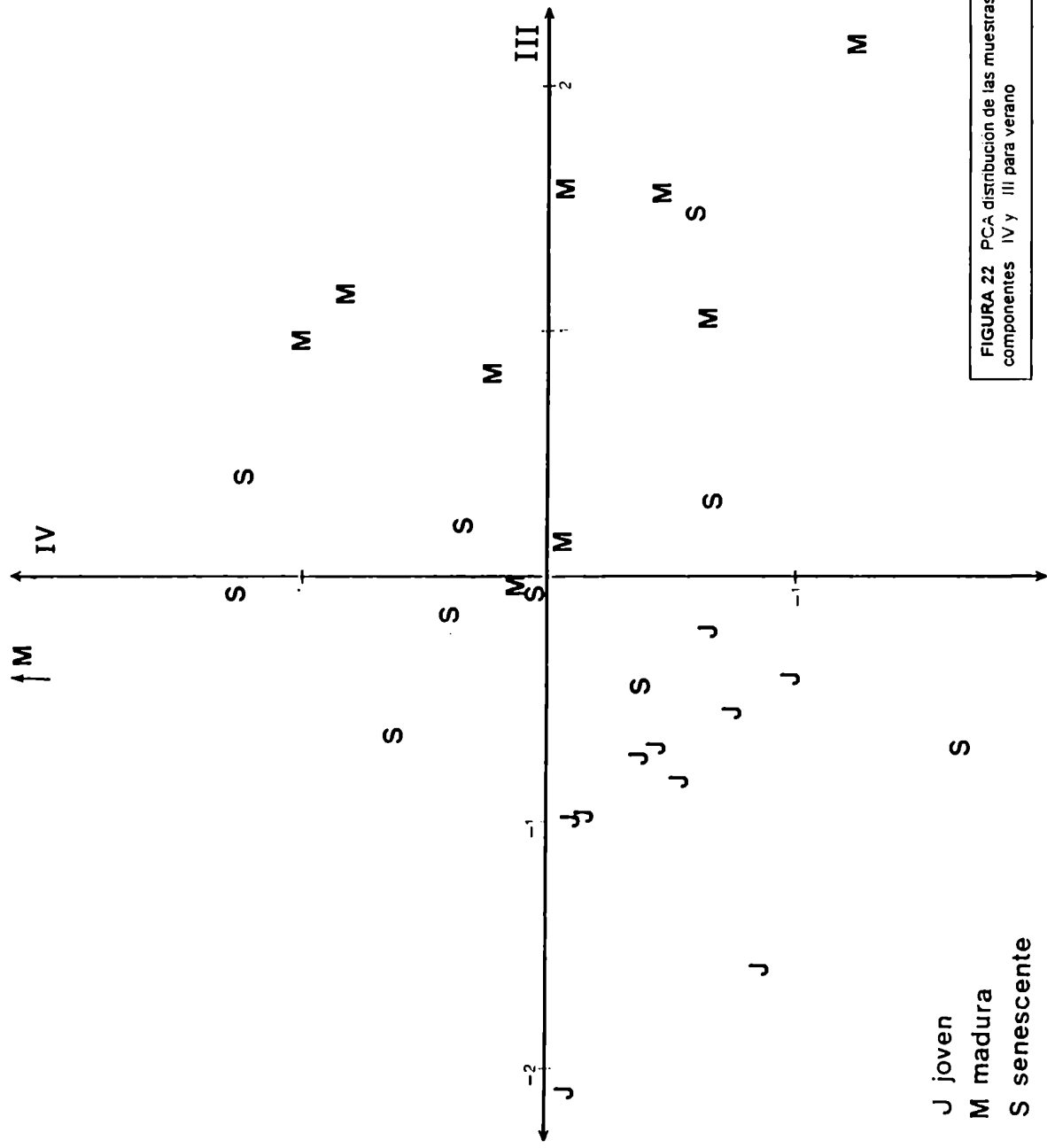


FIGURA 22 PCA distribución de las muestras en el espacio de los componentes IV y III para verano

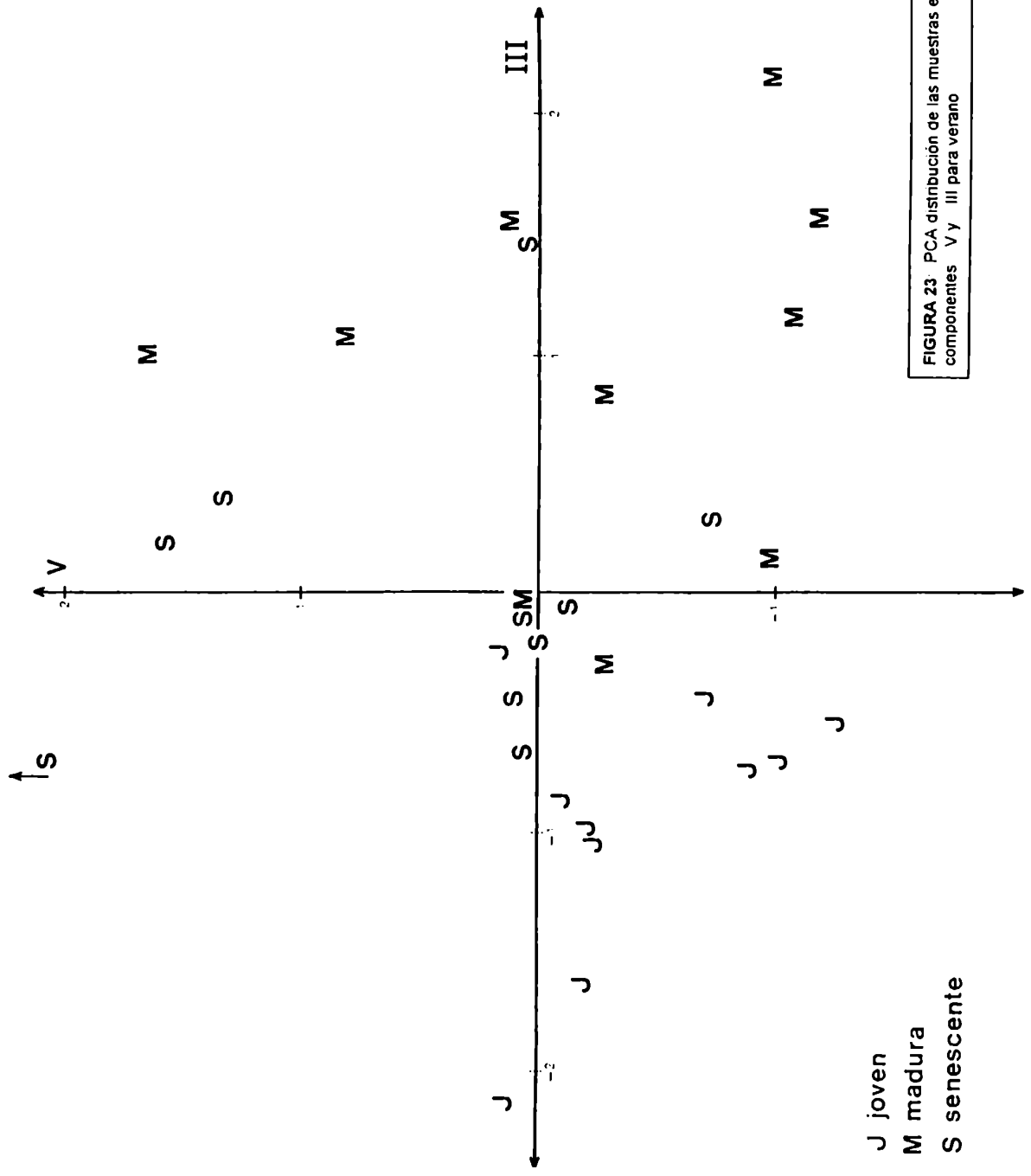


FIGURA 23 PCA distribución de las muestras en el espacio de los componentes V y III para verano

J joven
M madura
S senescente

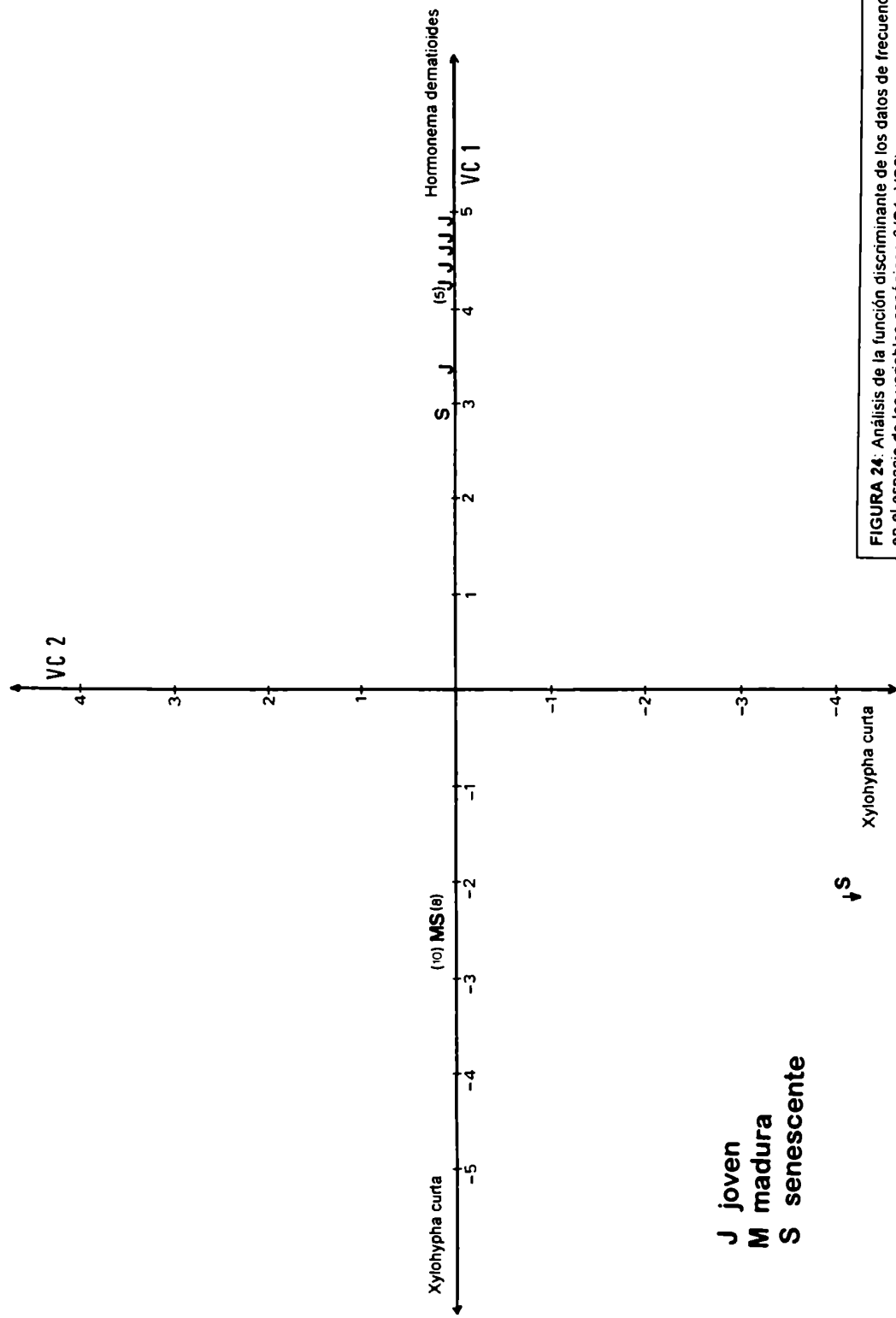
hojas jóvenes se encuentran ubicadas sobre los valores positivos de la primer función, mientras que las muestras correspondientes a hojas seniles y maduras se encuentran sobre los valores negativos. En la segunda función, las hojas maduras y seniles están ubicadas sobre los valores positivos (Fig.24). La clasificación general obtenida del análisis discriminante indica que el 70% de las muestras fueron clasificadas correctamente (Tabla 20). El porcentaje más bajo de clasificación se registró en las hojas seniles; dichas muestras fueron asignadas a maduras.

6.B.8.2 EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO

EN HOJAS JOVENES

Los primeros 4 componentes derivados del análisis de componentes principales (ACP), efectuado sobre la matriz de frecuencias fúngicas (18 especies X 40 muestras) explicaron el 43,10% de la variación entre muestras en relación a las especies presentes y sus valores de frecuencia. Las contribuciones de las especies pueden observarse en la Tabla 21.

Las censos correspondientes a otoño-invierno (mayo-agosto) se encuentran ubicados sobre el extremo positivo del componente uno (I), caracterizados por la presencia de *Pestalotiopsis oxyanthi*, que tiene valores de frecuencia altos. En el extremo negativo del componente están ubicadas las muestras correspondientes a primavera-verano (noviembre y marzo), las cuales están caracterizadas por la presencia de



Grupo	% clasificación correcta.	Joven	Madura	Senescente
Joven	100	10	0	0
Madura	100	0	10	0
Senescente	10	1	8	1
Total	70	11	18	1

TABLA 20.- Clasificación del **análisis discriminante** basado en los datos fúngicos del mes de **marzo** usando el estado de madurez de las hojas como variable discriminante.

ESPECIES FUNGICAS	C1	C2	C3	C4
X(2) PEST	0.874	-0.220	-0.045	0.129
X(3) ALTE	0.184	0.525	0.707	-0.017
X(4) CLCL	-0.179	-0.265	-0.011	-0.138
X(6) CLOX	0.169	-0.155	-0.093	-0.169
X(7) XYLO	0.224	0.195	-0.513	0.181
X(8) NIGR	-0.007	-0.252	-0.070	-0.205
X(9) FULA	0.191	-0.057	-0.144	0.830
X(10) EPIC	-0.077	0.800	-0.118	-0.132
X(11) PENI	0.122	-0.224	-0.133	-0.212
X(12) HORM	-0.760	0.273	0.151	-0.182
X(16) LEVA	-0.510	-0.356	-0.510	0.134
X(17) FUSU	-0.027	-0.098	0.016	0.774
X(18) LEPT	0.370	-0.062	0.385	-0.111
X(21) WARD	-0.392	-0.134	0.038	0.030
X(24) DREC	-0.072	-0.136	0.020	-0.092
X(25) P1TH	-0.043	0.635	0.042	-0.061
X(27) PHOM	0.000	-0.000	-0.000	0.000
X(28) CHAE	-0.161	-0.023	0.660	0.111
AUTOVALOR	2.128	1.868	1.700	1.579
% VAR.EX.	14.41	12.85	8.51	7.33

TABLA 21.- Contribuciones de las especies fúngicas a los primeros 4 componentes (C1-C4) derivados del análisis de componentes principales efectuado sobre hojas jóvenes.

Hormonema dematioides y las levaduras (Fig.25). Este factor estaría asociado a la temperatura mínima media (marzo:13,6°C; noviembre:11,2°C; mayo:7,1°C; agosto:4,8°C) y/o a las horas mensuales con temperaturas menores o iguales a 7°C (marzo:1-4; noviembre:0; agosto:230; mayo:52). Se puede observar que mayo/agosto y noviembre/marzo se agrupan por similitud en estos parámetros.

P. oxyanthi sería una especie fúngica otoño-invernal y *H. dematioides* y las levaduras serían primavera-estivales.

El componente dos (II) muestra la segregación de los censos dominados por *Epicoccum purpurascens* y *Pithomyces chartarum* y que corresponden a verano y otoño, (mayo y marzo) (Fig.25).

El componente tres (III) segrega las muestras dominadas por *Alternaria alternata* y *Chaetomium globosum* de los censos en que *Xylohypha curta* y las levaduras son dominantes. En este caso están ubicadas en los sectores positivos y negativos respectivamente (Fig.26).(verano de primavera). Este factor estaría asociado a las precipitaciones; que son mayores en primavera (noviembre) con respecto al verano (marzo).

El componente cuatro (IV) muestra la segregación de 4 muestras correspondientes a otoño (mayo), caracterizadas por la frecuencia alta de *Fusarium lateritium* y *F. sulphureum* (Fig.27). En el resto de las muestras las frecuencias de éstos es más baja o están ausentes. El factor 4 estaría asociado a la humedad relativa que es mayor en otoño con

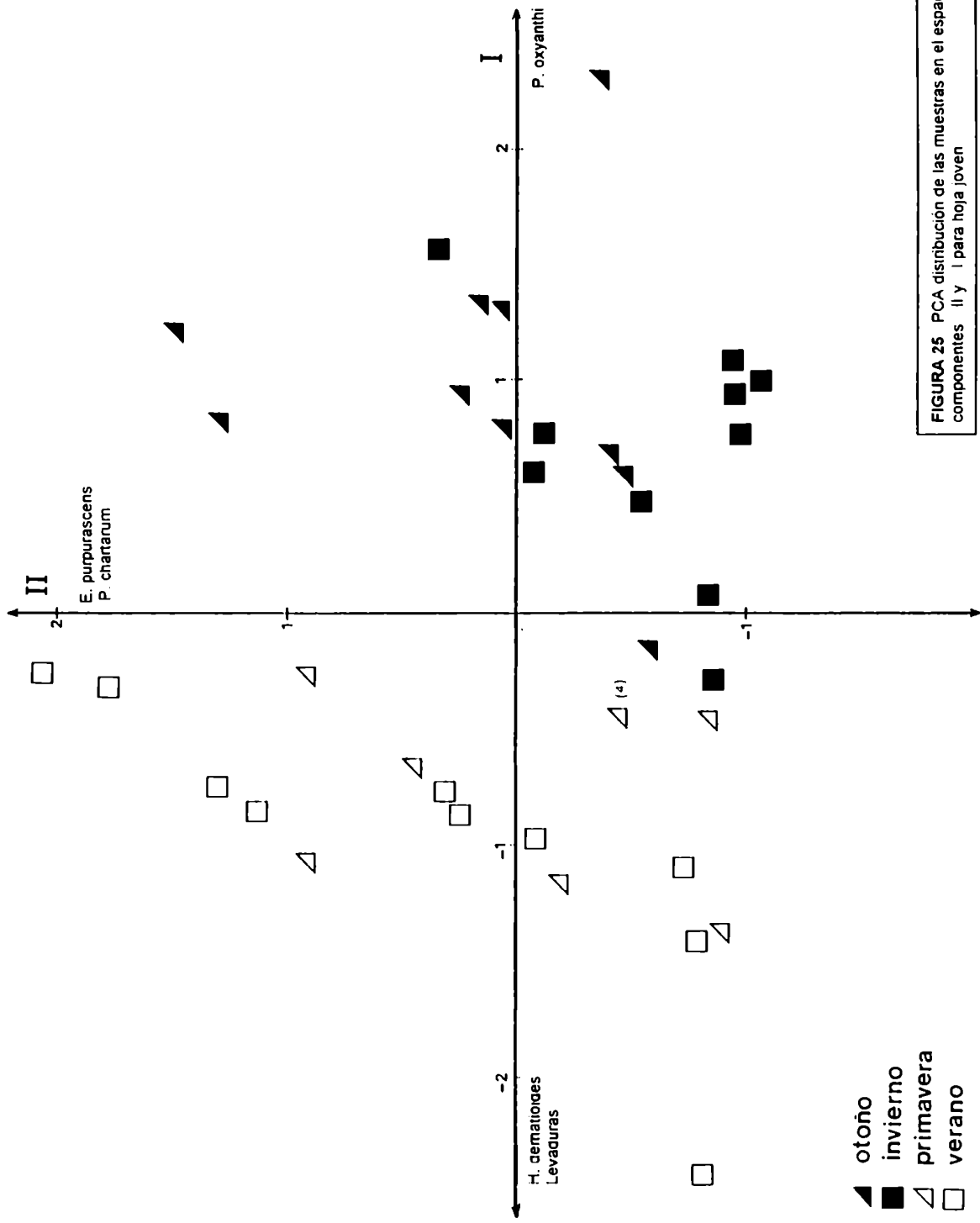


FIGURA 25. PCA distribución de las muestras en el espacio de los componentes I y II para hoja joven

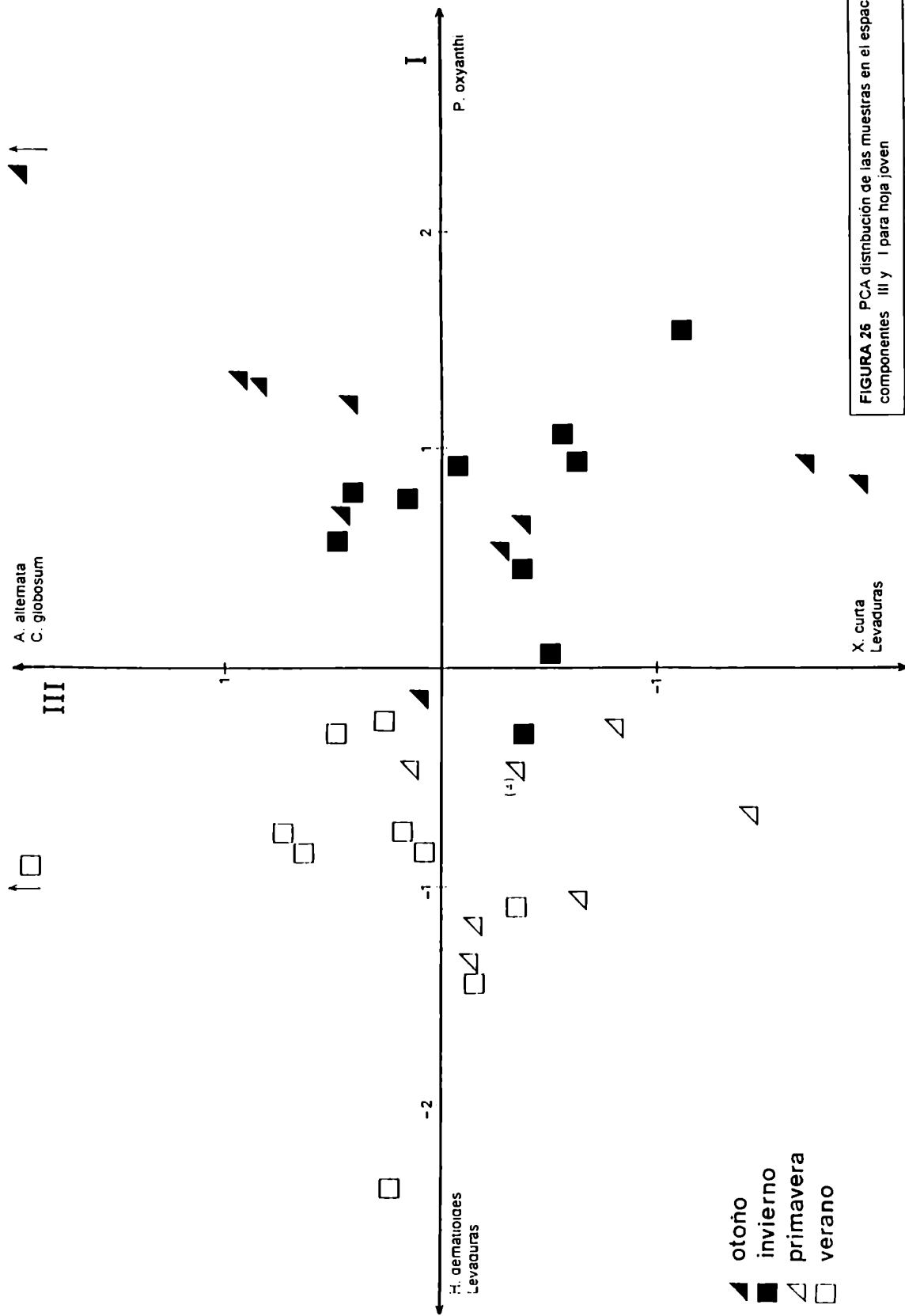


FIGURA 26 PCA distribución de las muestras en el espacio de los componentes III y I para hoja joven

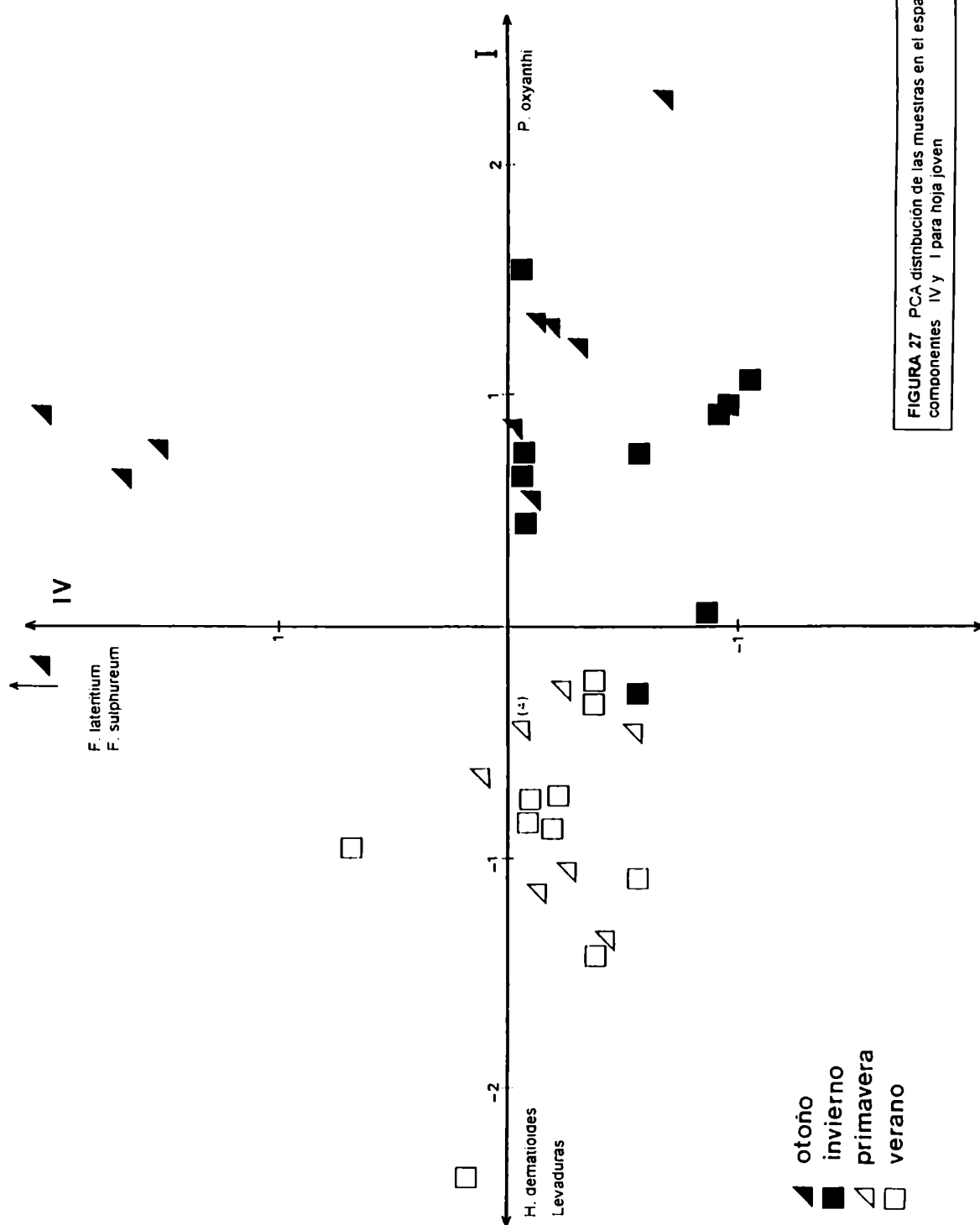


FIGURA 27 PCA distribución de las muestras en el espacio de los componentes IV y I para hoja joven

respecto al invierno.

La distribución de las muestras en el espacio de los componentes uno, dos, tres y cuatro (I, II, III y IV), puede observarse en las Figs. 25, 26 y 27. Las combinaciones de los componentes (I-II) y (I-III) son las que mejor reflejan los cambios estacionales de la comunidad fúngica de las hojas jóvenes.

La segregación estacional de las muestras fue confirmada mediante análisis discriminante (AD), utilizando como variable de agrupamiento la estación.

El análisis discriminante dio como resultado 3 funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. La primera función estuvo asociada con *P. oxanthi*, la segunda con *A. alternata*(-) y *Hormonema dematioides*(-).

La distribución de las muestras en relación a las 2 primeras funciones discriminantes (Fig.28) muestra que los censos de invierno y otoño están asociados con valores positivos de la función 1, mientras que las muestras de primavera y verano están asociadas con los valores negativos.

En la función 2 la segregación es menos clara. La mayoría de las muestras de primavera e invierno están ubicados sobre valores positivos, mientras que los de verano y otoño sobre valores negativos.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante muestra que el 85% de las muestras fueron clasificadas correctamente (Tabla 22).

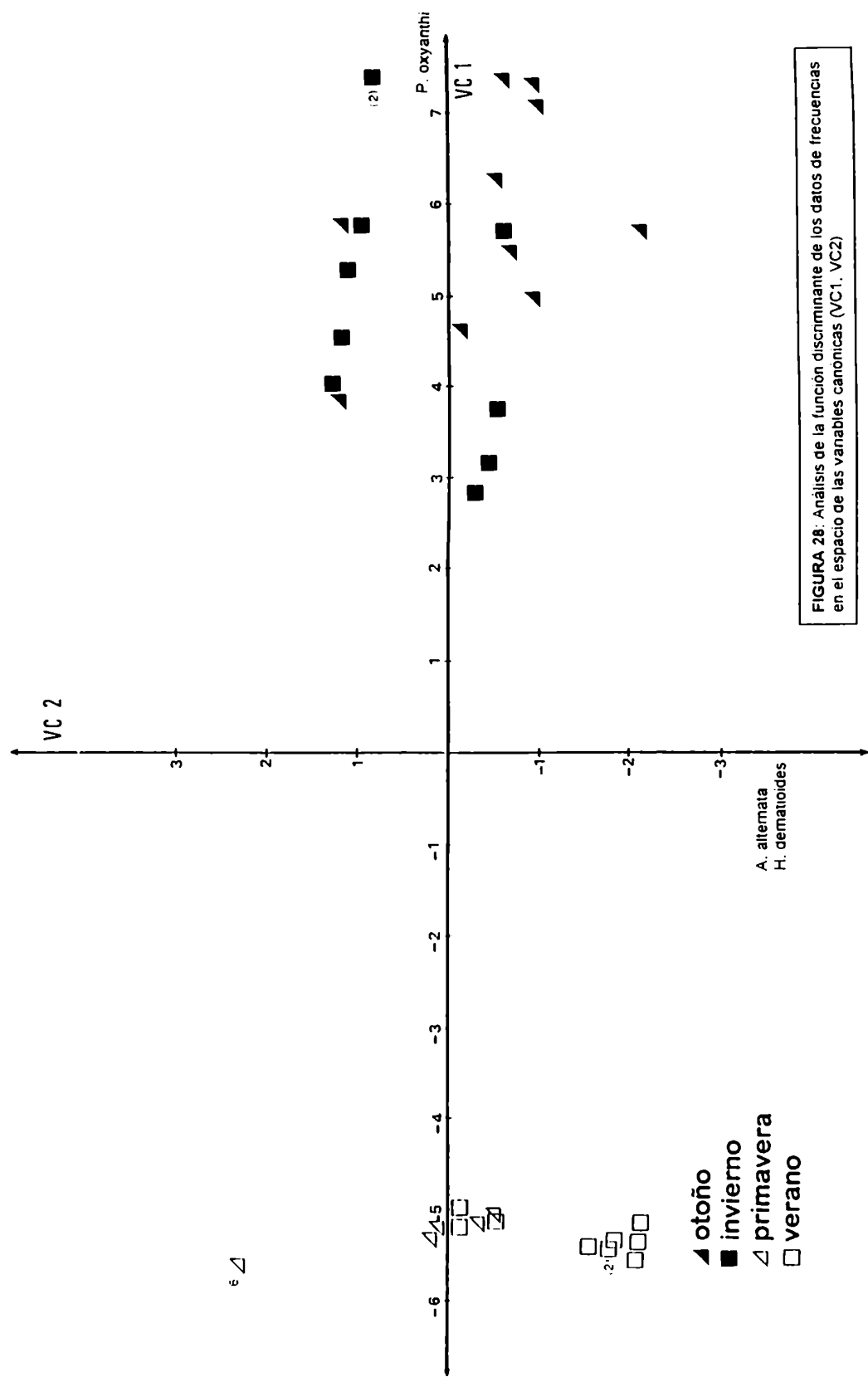


FIGURA 28: Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

Grupo	% clasificación correcta	My	Ag	Nv	Mz
My	80	8	2	0	0
Ag	90	1	9	0	0
Nv	70	0	0	7	3
Mz	100	0	0	0	10
Total	85	9	11	7	13

TABLA 22.- Clasificación del **análisis discriminante** basado en los datos fúngicos de **hojas jóvenes** usando el mes como variable discriminante.

EN HOJAS MADURAS

Los primeros cuatro componentes derivados del análisis de componentes principales (PCA), efectuado sobre la matriz de frecuencias fúngicas (23 especies X 40 muestras) explicaron el 39,28 % de la variación entre las muestras en relación a las especies presentes y sus valores de frecuencia. Las contribuciones de las especies pueden observarse en la Tabla 23

El componente uno (I) muestra la segregación de 1 censo correspondiente a otoño, (mayo) y que está localizado sobre el sector positivo del componente y se halla caracterizado por la frecuencia alta de *Wardomyces aff. inflatus* y *Eurotium rubrum*. Estas especies son poco frecuentes o están ausentes en el resto de las muestras, las cuales están localizadas tanto en el sector negativo del componente como en el sector positivo pero valores cercanos a cero.

El componente dos (II) muestra la segregación de 8 muestras correspondientes a verano y otoño (meses de mayo y marzo), las cuales están caracterizadas por la presencia de *Cladosporium sphaerospermum* y *A. alternata*. Están localizadas sobre el sector positivo del componente. En el extremo negativo de este componente se localizan las muestras correspondientes a invierno y primavera (meses de agosto y noviembre), que están caracterizadas por la presencia de *P. oxanthi* y *H. dematioides*. El resto de las muestras se localizan en el sector intermedio del componente.

El componente tres (III) muestra la segregación de un

ESPECIES FUNGICAS	C1	C2	C3	C4
X(2) PEST	-0.264	-0.539	-0.275	0.006
X(3) ALTE	-0.237	0.610	0.186	-0.209
X(4) CLCL	0.471	0.294	0.339	-0.072
X(5) CLOX	-0.162	-0.035	-0.069	-0.145
X(6) CLSP	0.003	0.639	0.034	0.039
X(7) XYLO	0.045	0.083	-0.123	-0.134
X(8) NIGR	-0.062	0.577	-0.185	-0.083
X(9) FULA	-0.075	-0.060	-0.045	-0.052
X(10) EPIC	-0.163	-0.062	-0.045	-0.155
X(11) PENI	-0.096	-0.036	0.018	-0.012
X(12) HORM	-0.073	-0.514	-0.038	-0.007
X(13) ACRE	-0.103	-0.055	-0.123	-0.192
X(14) MME5	-0.013	-0.018	-0.072	0.953
X(15) MDE1	0.026	0.343	0.027	0.036
X(16) LEVA	-0.169	-0.112	0.346	0.420
X(19) MICR	0.070	0.447	0.019	0.008
X(20) FUOX	0.028	-0.039	-0.051	-0.027
X(21) WARD	0.955	-0.062	-0.061	-0.040
X(22) EURO	0.955	-0.062	-0.061	-0.040
X(23) PAEC	-0.013	-0.018	-0.072	0.953
X(25) PLTH	-0.068	0.391	-0.143	-0.065
X(26) SCYT	0.012	-0.016	0.947	-0.023
X(27) PHOM	0.012	-0.016	0.947	-0.023
AUTOVALOR	2.300	2.268	2.258	2.166
% VAR.EX.	11.43	9.82	9.66	8.37

TABLA 23.- Contribuciones de las especies fúngicas a los primeros 4 componentes (C1-C4) derivados del análisis de componentes principales efectuado sobre hojas maduras.

censo de verano ubicado en el extremo positivo del componente el cual está caracterizado por la dominancia de *Scytalidium thermophilum* y *Phoma pomorum*; dichas especies son poco frecuentes o están ausentes en el resto de las muestras.

El componente cuatro (IV) muestra la segregación de una muestra correspondiente a otoño, la cual está caracterizada por la alta frecuencia de MME5. Esta especie es poco frecuente o está ausente en el resto de las muestras.

La combinación de los componentes uno y dos (I Y II) muestra una clara segregación de las muestras de primavera y verano (noviembre y marzo) (Fig.29). Ninguna combinación del resto de los componentes mostró una clara segregación de muestras de invierno y otoño (agosto y mayo).

Las censos fueron analizados mediante análisis discriminante (AD), utilizando como variable de agrupamiento la estación. El análisis discriminante dio como resultado una sola función, la cual explicó el 100% de la varianza total, que estuvo asociada con *A. alternata*(-). La distribución de las muestras en relación a dicha función indica que las muestras correspondientes a primavera (noviembre) se encuentran ubicadas sobre los valores positivos, mientras que las muestras de verano (marzo) se encuentran sobre los valores negativos (Fig.30). La clasificación general obtenida del análisis discriminante indica que sólo el 45% de los censos fueron clasificados correctamente (Tabla 24). El bajo porcentaje de clasificación se debió a que las muestras de otoño e invierno (mayo y agosto) fueron asignadas a otros

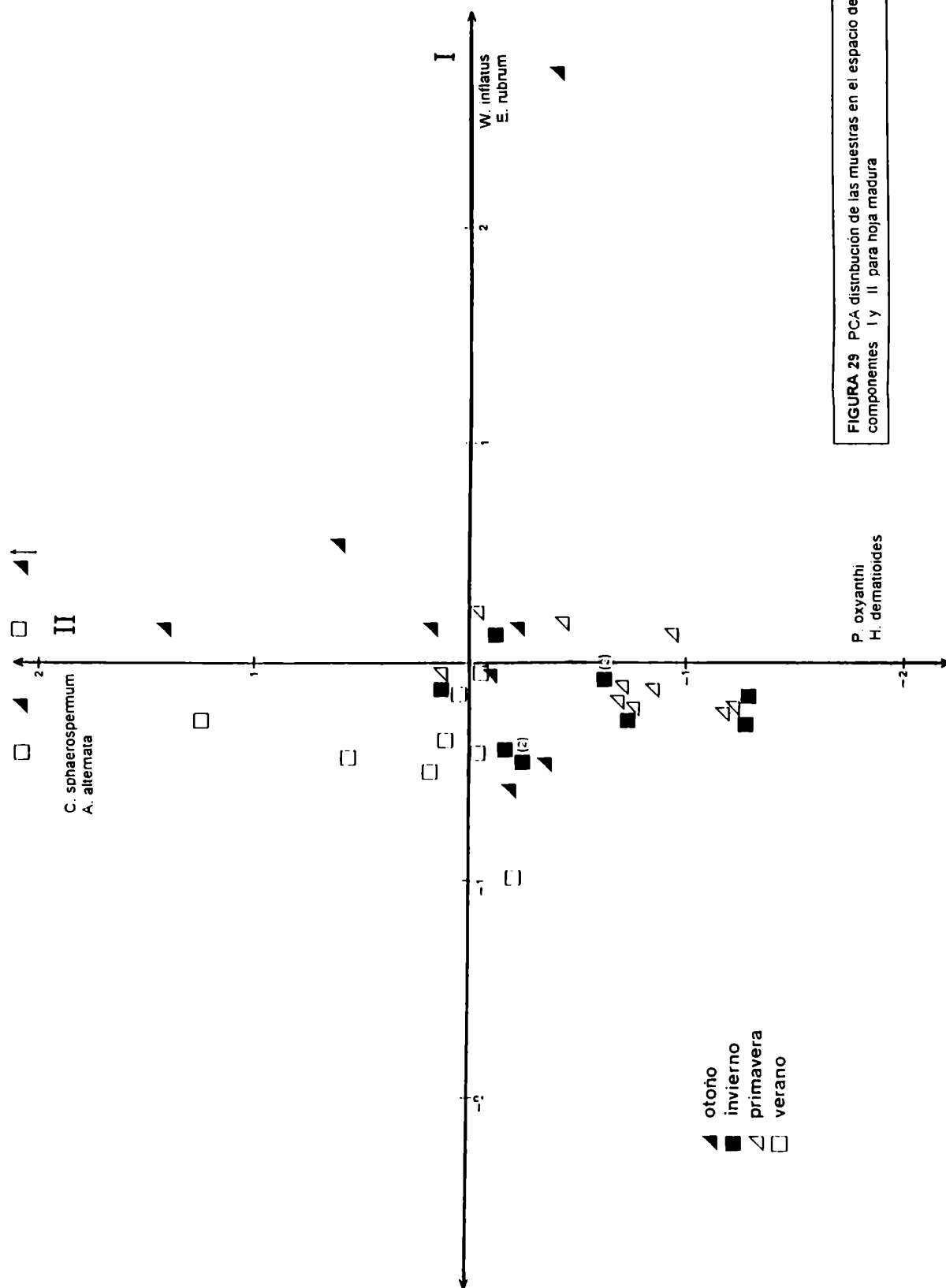
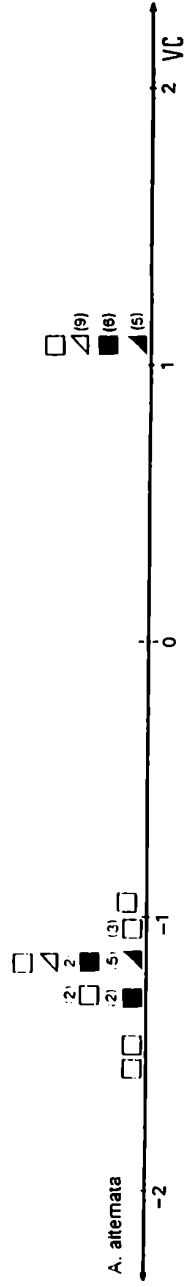


FIGURA 29 PCA distribución de las muestras en el espacio de los componentes I y II para hoja madura



▲ otoño
 ■ invierno
 △ primavera
 □ verano

FIGURA 30: Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de la variable canónica

GRUPO	% clasificación correcta	My	Ag	Nv	Mz
My	0	0	0	5	5
Ag	0	0	0	6	4
Nv	90	0	0	9	1
Mz	90	0	0	1	9
Total	45	0	0	21	19

TABLA 24.- Clasificación del análisis discriminante basado en los datos fúngicos de **hojas maduras**, usando el mes como variable discriminante.

meses de acuerdo con los valores de frecuencia de *A. alternata*; los censos con alta frecuencia de *A. alternata* fueron asignados a verano (marzo), mientras que las muestras, donde la frecuencia de dicha especie fue baja o estuvo ausente, fueron asignadas a primavera (noviembre).

EN HOJAS SENESCENTES

Los primeros 4 componentes derivados del análisis de componentes principales (PCA), efectuado sobre la matriz de frecuencias fúngicas (15 especies X 40 muestras) explicaron el 57,54 % de la variación entre muestras en relación a las especies presentes y sus valores de frecuencia. Las contribuciones de las especies pueden observarse en la Tabla 25.

El componente uno (I), muestra la segregación de 3 censos, 2 correspondientes al verano (mes de marzo) y 1 a otoño (mes de mayo). Estas muestras localizadas sobre el extremo positivo del componente, están caracterizadas por la alta frecuencia de *Hormonema dematioides* y *Xylohypha curta*. Sobre valores negativos o positivos muy bajos del mismo componente se localiza el resto de los censos de verano y otoño (marzo y mayo) así como las correspondientes a invierno y primavera (los meses de noviembre y agosto).

El componente (II) permite la segregación de las muestras correspondientes a primavera, verano e invierno (los meses de noviembre, marzo y agosto). Dichas muestras están ubicadas en el sector positivo del componente y se caracterizan por la

ESPECIES FUNGICAS	C1	C2	C3	C4
X(2) PEST	-0.235	-0.742	-0.264	-0.298
X(3) ALTE	-0.340	0.483	0.154	0.331
X(4) CLCL	0.280	0.575	-0.190	-0.050
X(5) CLOX	0.228	-0.123	-0.071	0.829
X(6) CLSP	-0.270	-0.097	0.418	0.163
X(7) XYLO	0.894	-0.015	0.138	0.051
X(8) NIGR	0.010	0.555	-0.306	-0.234
X(10) EPIC	-0.251	0.653	-0.019	-0.155
X(11) PENI	-0.041	-0.219	-0.126	0.008
X(12) HORM	0.910	0.019	0.174	0.012
X(14) MME5	-0.004	-0.113	-0.224	0.110
X(15) MDE1	0.258	-0.069	0.778	-0.087
X(16) LEVA	0.104	0.017	0.890	0.065
X(21) WARD	-0.145	0.010	0.072	0.881
X(29) PSEU	0.000	0.000	0.000	0.000
AUTOVALOR	2.164	1.941	1.920	1.796
% VAR.EX.	18.03	15.47	13.38	10.66

TABLA 25.- Contribuciones de las especies fúngicas a los primeros 4 componentes (C1-C4) derivados del análisis de componentes principales efectuado sobre hojas senescentes.

presencia de *Epicoccum purpurascens*, *C. cladosporioides* y *Nigrospora oryzae*. Sobre los valores negativos del componente dos (II) se ubican los censos correspondientes a invierno y a verano (1), de otoño (1) y primavera (2); estas muestras están caracterizadas por la presencia de *Pestalotiopsis oxyanthi*.

El componente tres (III) muestra la segregación de las muestras correspondientes al verano (marzo), localizadas sobre valores positivos altos, donde las especies dominantes son las levaduras y MDE1. El resto está localizado sobre el sector negativo del componente o positivos bajos debido a la menor frecuencia o ausencia de levaduras y MDE1.

El componente cuatro (IV) muestra la segregación de 6 muestras, 3 correspondientes a otoño (mes de mayo), 2 de verano (marzo) y 1 de primavera (noviembre). Están localizadas en el extremo positivo del componente, caracterizadas por la alta frecuencia de *Wardomyces aff. inflatus* y *Cladosporium oxysporum*. Dichas especies son poco frecuentes o están ausentes en el resto de las muestras, las cuales están ubicadas sobre los valores negativos o positivos muy bajos de dicho componente.

La combinación de los componentes dos y tres (II y III) Fig.31, permite una clara segregación estacional de las comunidades fúngicas de las hojas seniles (Fig 31).

La segregación estacional de los censos fue confirmada mediante análisis discriminante (AD), utilizando como variable de agrupamiento la estación.

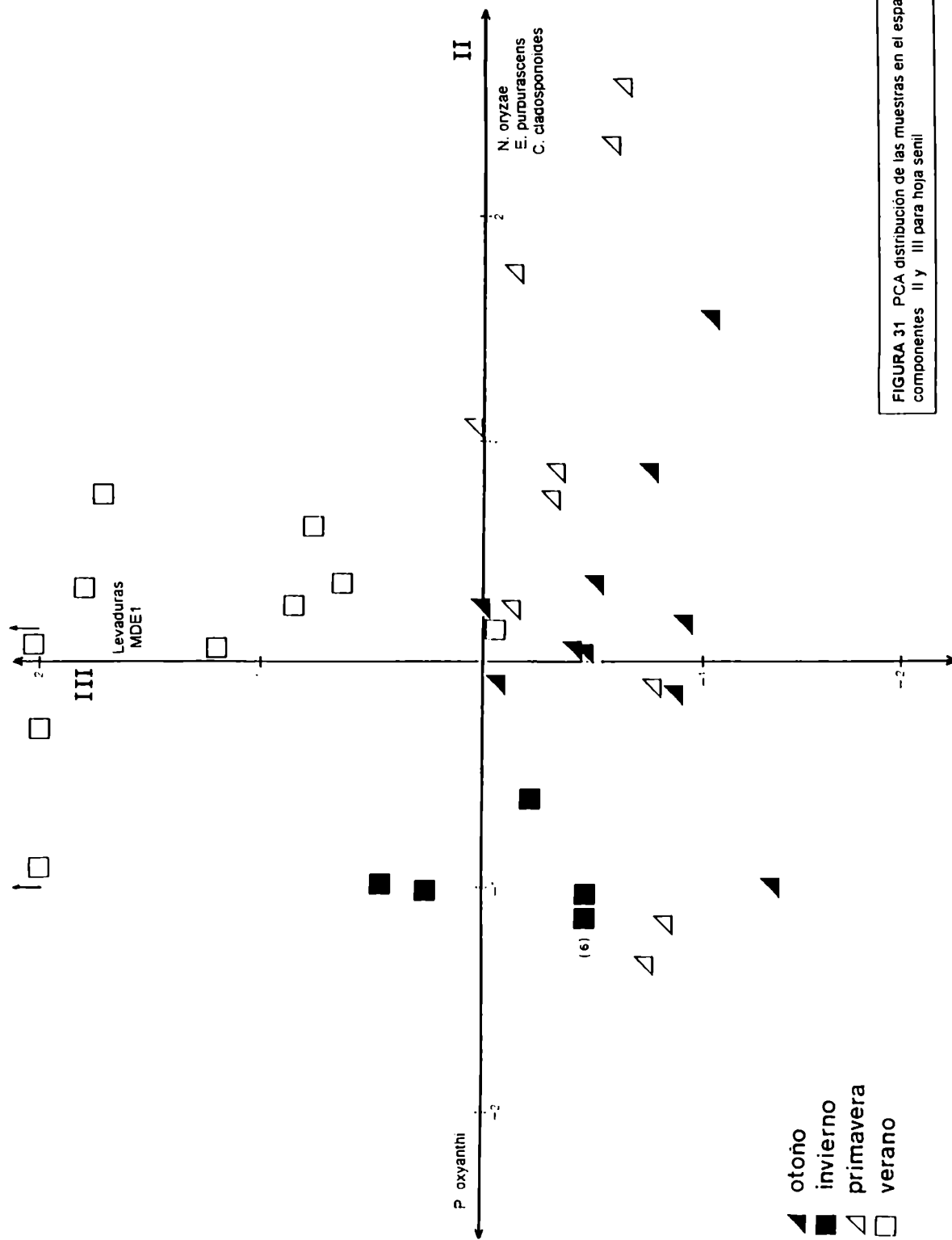


FIGURA 31 PCA distribución de las muestras en el espacio de los componentes II y III para hoja senil

El análisis discriminante dio como resultado 3 funciones, las cuales explicaron el 100% de la varianza total. La primera función estuvo asociada con las levaduras(-) y *P. oxyanthi* y la segunda con *P. oxyanthi*(-) y levaduras(-) y la tercera con *E. purpurascens*.

La distribución de los censos en relación a las 2 primeras funciones discriminantes (Fig.32) determinan que las muestras de invierno y primavera (agosto y noviembre) están asociados con valores positivos de la función 1, mientras que las muestras de verano (marzo) están asociados con los valores negativos.

En la función 2 la segregación es menos clara. La mayoría de los censos de otoño (mayo), están ubicados en el extremo positivo; los de invierno (agosto) sobre valores negativos y los de verano (marzo) más cerca del origen.

La clasificación general obtenida del análisis discriminante determina que el 85% de las muestras fueron confirmadas correctamente (Tabla 26)

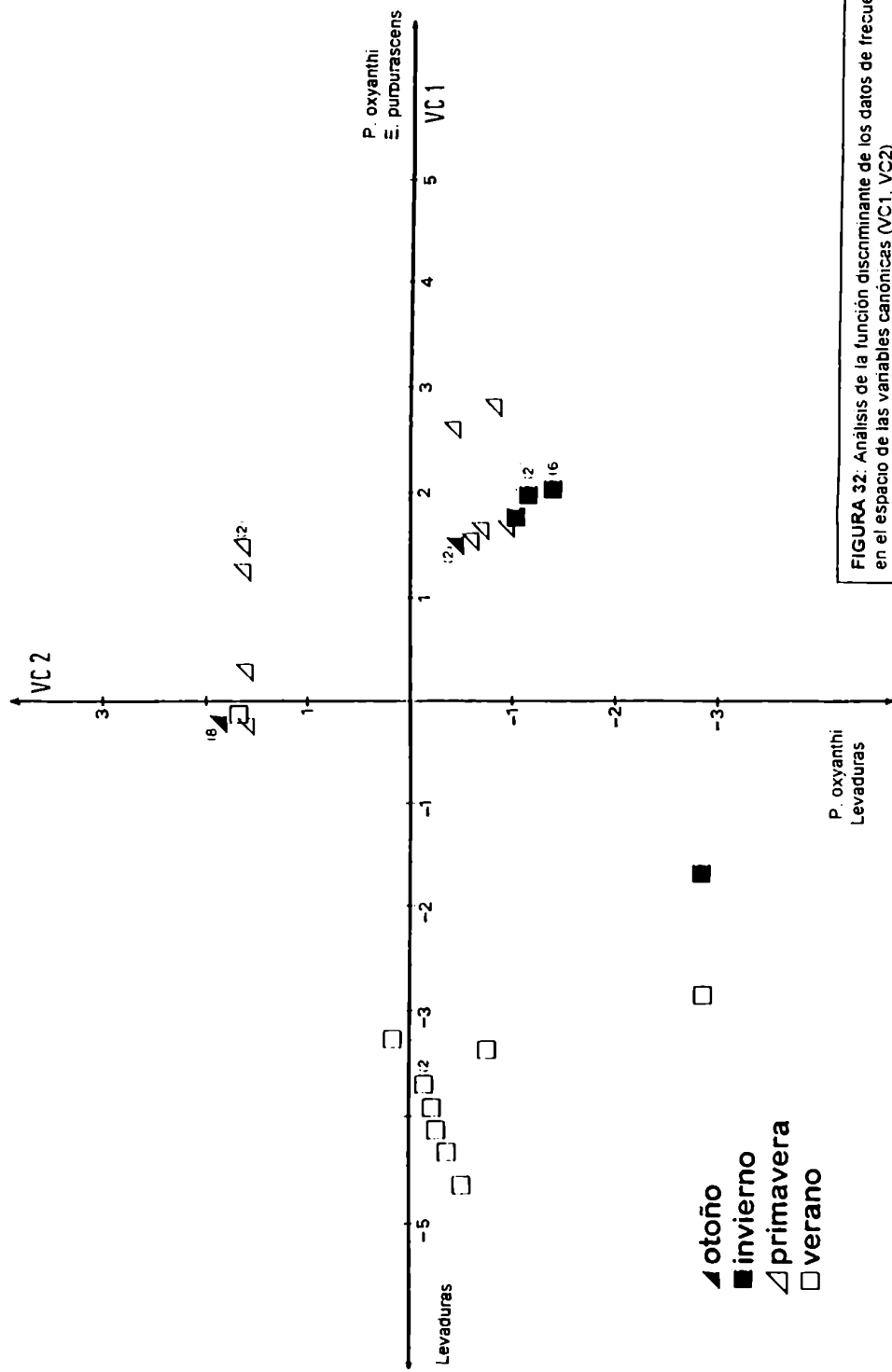


FIGURA 32. Análisis de la función discriminante de los datos de frecuencias en el espacio de las variables canónicas (VC1, VC2)

GRUPO	% clasificación correcta	My	Ag	Nv	Mz
My	80	8	2	0	0
Ag	90	0	9	0	1
Nv	60	1	3	6	0
Mz	90	1	0	0	9
Total	80	10	14	6	10

TABLA 26.- Clasificación del **análisis discriminante** basado en los datos fúngicos de **hojas senescentes** usando el mes como variable -discriminante.

7 CONCLUSIONES

7.1 DISTINTOS SECTORES DE LA HOJA

- El porcentaje de humedad de la hoja es mayor en la base y disminuye hacia el ápice.

- La cara adaxial de la hoja presenta células epidérmicas con prolongaciones papilosas y los canales entre células son más profundos lo que favorece la deposición de las esporas y el crecimiento y anclaje de las hifas.

- La colonización a nivel de los estomas es mayor que en el resto de la hoja. La cara adaxial está más colonizada.

- La parte basal de la hoja carece de estomas y también de micelio superficial.

- La longitud de micelio es mayor en la base, decrece hacia el centro y aumenta en el ápice; podría explicarse por la mayor radiación que recibe la hoja en el centro.

- Las especies con mayores frecuencias para todos los sectores de la hoja madura fueron *Cladosporium* cladosporioides, *Alternaria* alternata, *Pestalotiopsis oxanthi* y las levaduras.

7.2 DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ DE LA HOJA Y DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO

- En todas las estaciones del año el porcentaje de humedad de la hoja disminuye con la edad de la misma.

- La colonización superficial aumenta con la edad de la hoja y es mayor en primavera y verano.

- Los diámetros hifales aumentaron desde la primavera al invierno, apareciendo en esta última valores máximos exclusivos de diámetro (3,2-4,8M).

- Las hojas jóvenes de *Pinus taeda* están limpias desde el punto de vista micológico. Los propágulos que son diseminados por el aire tienen tendencia a adherirse más en la cara adaxial, de textura áspera, debido a la mayor concentración de cristales de ceras epicuticulares y células epidérmicas con prolongaciones papilosas.

- Podríamos postular que la colonización se inicia por la cara adaxial en la hoja joven y progresa hasta colonizar ambas caras en la hoja madura y senescente. La cara adaxial suele estar más colonizada; esta diferencia es menos notable en la senescencia. Los estomas son las zonas de mayor densidad hifal. En los censos de primavera y verano se observa mayor colonización superficial mientras que en otoño e invierno hay menos micelio en el filoplano; posiblemente los valores altos de micelio y biomasa total se deban a

micelio endógeno.

- Se aislaron 428 cepas de hifomicetes de los que resultaron 48 taxa diferentes más el grupo de las levaduras.

- Podríamos postular que la colonización se inicia en los primordios en agosto y se incrementa hasta cierto punto en la hoja madura, pero no indefinidamente, porque el micelio muere, hay menos nutrientes, ya que en las hojas maduras y senescentes de agosto se obtienen menor número de colonias que en las hojas jóvenes.

- Se puede pensar que la colonización en las primeras etapas evoluciona a mayor velocidad y luego se frena dando como resultado que la hoja madura sea semejante a la senescente en cuanto a la colonización como ocurre también en otros sustratos.

- Las especies más importantes en la filosfera de Pinus taeda por presentar frecuencias mayores en todas o algunas estaciones y/o estadios de la hoja son: Pestalotiopsis oxyanthi, Alternaria alternata, Cladosporium cladosporioides, C. oxysporum, C. sphaerospermum, Nigrospora oryzae, Epicoccum purpurascens, Hormonema dematioides y las levaduras. Con frecuencias menores Xylohypha curta, Penicillium sp., Fusarium lateritium, Wardomyces aff. inflatus, Acremonium strictum, MME5 y MDE1. Los restantes aislamientos tienen una frecuencia menor al 5%.

- No se observa una estacionalidad marcada en la distribución de las especies, excepto en *Pestalotiopsis oxyanthi* y *Epicoccum purpurascens*. El primero tiene frecuencias mayores en invierno mientras que *E. purpurascens* no se encuentra en esta estación.

- Si consideramos las poblaciones fúngicas en relación a los distintos estadios de madurez de las hojas vemos que las distintas especies de *Cladosporium* tienen frecuencias menores o están ausentes en las hojas jóvenes, aumentando en las hojas maduras y senescentes.

- Las levaduras predominaron en hojas jóvenes durante la mayor parte del año y en verano tuvieron frecuencias altas en todos los estadios de madurez de las hojas.

- Los primeros colonizadores de la hoja son los epífitos no patógenos, habitantes del filoplano como *Hormonema dematioides* y varias especies de levaduras, acompañados por otras de menor importancia como *E. purpurascens*, *C. cladosporioides*, *X. curta* y *Drechslera bicolor* que aparecen esporádicamente. Luego se incorporan los epífitos no patógenos, invasores del filoplano como *Alternaria alternata*; *E. purpurascens* y *Hormonema dematioides* aumentan su importancia manteniendo las levaduras su frecuencia. Como especies acompañantes se aíslan *C. cladosporioides*, *N. oryzae*, *W. aff. inflatus*, *P. chartarum*, *P. pomorum* y *Ch. globosum*.

En otoño aparece *Pestalotiopsis oxyanthi* con frecuencia alta. Esta especie se mantiene a lo largo de la vida de la hoja alcanzando el 85% de frecuencia en las hojas senescentes de invierno.

En la hoja madura de primavera (1 año de vida), *P. oxyanthi* mantiene alta su frecuencia y *C. cladosporioides* aumenta su importancia.

- Al cabo de un año *H. dematioides* y las levaduras hialinas son reemplazadas por las especies filamentosas.

- Algunas de las especies aisladas de la filosfera de *P. taeda* como *P. oxyanthi*, *A. alternata*, *E. purpurascens*, *F. lateritium* y *F. oxysporum* se mantienen como población en la hojarasca (Godeas, 1982).

7.3 COMUNIDADES FUNGICAS

- En el PCA realizado en otoño sobre la matriz de frecuencias fúngicas, la combinación de los componentes I y III muestra una clara segregación de las muestras de hojas jóvenes y senescentes. El AD dio como resultado una sola función, asociada a *P. oxyanthi*. Las hojas jóvenes se caracterizaron por la alta frecuencia de *P. oxyanthi*, mientras que las hojas senescentes se encuentran sobre valores negativos de dicha función. Las muestras de hojas maduras fueron asignadas al estadio juvenil o senil según la frecuencia de *P. oxyanthi*.

- En el PCA realizado en invierno sobre la matriz de frecuencias fúngicas el componente II permitió diferenciar las hojas juveniles de las seniles. Las hojas jóvenes se caracterizaron por la frecuencia alta de levaduras mientras que las senescentes tienen frecuencia baja de levaduras y se caracterizan por la presencia de *P. oxyanthi*. Las muestras de hojas maduras fueron asignadas a jóvenes o seniles según la frecuencia de las levaduras.

- En el PCA realizado sobre la matriz de frecuencias fúngicas de primavera la combinación de los componentes I y II muestra la segregación de las hojas según la edad. Las hojas seniles se caracterizan por la presencia de *A. alternata* y *E. purpurascens*. Las hojas jóvenes y maduras se caracterizan por la presencia de levaduras. El componente II separa las hojas maduras, caracterizadas por *P. oxyanthi* y *C. oxysporum*, de las hojas jóvenes ubicadas en el sector negativo del componente.

- En el PCA realizado sobre la matriz de frecuencias fúngicas de verano, la combinación de los componentes III y IV, III y V indican una clara segregación de las muestras correspondientes a hojas jóvenes, maduras y senescentes. Las hojas jóvenes se caracterizan por la presencia de *Hormonema dematioides* y las maduras por *P. oxyanthi*. El porcentaje más bajo de clasificación correspondió a hojas seniles. Dichas muestras fueron asignadas al grupo de las maduras.

- En el PCA realizado sobre la matriz de frecuencias fúngicas de hojas jóvenes el componente I segrega las muestras de otoño-invierno, caracterizadas por la presencia de *P. oxyanthi* de las muestras de primavera-verano, caracterizadas por la presencia de *Hormonema dematioides* y las levaduras. Este factor estaría asociado a la temperatura. El componente III segrega los censos de verano caracterizados por *A. alternata* y *Chaetomium globosum*, de los censos de primavera, caracterizados por *Xylohypha curta* y las levaduras. Este factor podría estar relacionado con las precipitaciones que fueron mayores en primavera con respecto al verano. El componente IV segrega cuatro censos de otoño caracterizados por *F. lateritium* y *F. sulphureum*.

- En el PCA realizado sobre la matriz de frecuencias fúngicas de hojas maduras la combinación del factor I y II segregó los censos de primavera, caracterizados por *P. oxyanthi* y *H. dematioides* de los censos de verano caracterizados por *C. sphaerospermum* y *A. alternata*.

- En el PCA realizado sobre la matriz de frecuencias fúngicas de hojas senescentes la combinación de los componentes II Y III permitió la segregación de los censos de primavera, caracterizados por *N. oryzae*, *E. purpurascens* y *C. cladosporioides*, de los de verano caracterizados por las levaduras y MDE1 y los de invierno, caracterizados por *P. oxyanthi*.

B BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, E. A., H. C. HOCH, J. R. STEDMAN & R. J. STAVELY 1991. Influence of leaf surface features on spore deposition and the epiphytic growth of phytopathogenic fungi. In Microbial Ecology of leaves. Eds. J. H. Andrews and S. S. HIRANO. Springer-Verlag, New York.
- ANDREWS, J. H. & S. S. HIRANO 1991. Microbial Ecology of leaves. Brock/Springer. Series in Contemporary Bioscience, Madison, Wisconsin, pp. 499.
- ANDREWS, J. H., & C. M. KENERLEY, 1980. Microbial populations associated with buds and young leaves of apple. Can. J. Bot. 58: 847-855.
- ANDREWS, J. H., C. M. KENERLEY & E. NORDHEIM, 1980. Positional variation in phylloplane microbial populations within an apple tree canopy. Microb. Ecol. 6: 71-84.
- ARAMBARRI, A. M. 1981. Micoflora de la hojarasca de *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus pumilio* I. Bol. Soc. Arg. Bot. 20 (1-2): 19-30.
- ARAMBARRI, A. M., I. J. GAMUNDI & A. M. BUCSINSZKY, 1981. Micoflora de la hojarasca de *Nothofagus dombeyi* III. Darwiniana 23 (2-4): 327-348.
- ARAMBARRI, A. M., & H. A. SPINEDI, 1984. Micoflora de la hojarasca de *Nothofagus pumilio* III. Darwiniana 25 (1-4): 321-330.
- ARAMBARRI, A. M., & I. J. GAMUNDI, 1984. Micoflora de la hojarasca de *Nothofagus pumilio* y *Nothofagus obliqua* II.

- Darwiniana 25 (1-4): 255-265.
- BÄÄTH, E. & B. SÖDERSTRÖN, 1979. The significance of hyphal diameter in calculation of fungal biovolume. Dikos 33: 11-14.
- BAKER, G. E., P. H. DUNN & W. S. SAKAI, 1979. Fungus communities associated with leaf surfaces on endemic vascular plants in Hawaii. Mycologia 71 (2): 272-292.
- BAKER, K. F. & R. J. COOK, 1974. Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman, San Francisco, reprinted ed. 1982. Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN. 433pp.
- DARKLUD, P. 1987. Occurrence and pathogenicity of *Lophodermium piceae* appearing as an endophyte in needles of *Picea-Abies*. Trans. Br. Mycol. Soc. 89 (3): 307-313.
- BARY, A. de 1866. Morphology and Physiology of the Fungi, Lichens and Myxomycetes.
- DASHI, E. & N. J. FOKKEMA, 1977. Environmental factors limiting growth of *Sporobolomyces roseus* an antagonist of *Cochliobolus sativus* on wheat leaves. Trans. Br. Mycol. Soc. 68: 15-25.
- DATISTA CHAVES, A. & R. CIFERRI. 1963. Capnodiales. Saccardo: Monographiae Mycologicae 2: 1-298
- BENNETT, F. T. 1928. On *Cladosporium herbarum*: the question of its parasitism, and its relation to "thinning out" and "deaf ears" in wheat. Annals of Applied Biology 15: 191-212.
- BERNSTEIN, M. E. & G. C. CARROLL, 1977. Microbial populations on Douglas fir needle surfaces. Microb. Ecol. 4: 41-52.
- BERNSTEIN, M. E., H. M. HOWARD & G. C. CARROLL, 1973.

- Fluorescence microscopy of Douglas fir foliage epiflora. Can. J. Microbiol. 19 (9):
- BERTONI, M. D. & D. CABRAL, 1988. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis* II: Distribution of endophytes. Nova Hedwigia 46 (3-4): 491-502.
- BERTONI, M. D., D. CABRAL, N. ROMERO & DUBCOVSKY, 1993. Endofitos fúngicos en especies sudamericanas de *Festuca* (Poaceae). Bol. Soc. Arg. Bot. 29 (1-2): 25-34.
- BISSETT, J. & D. PARKINSON 1979. Long-term effects of fire on the composition and activity of the soil microflora of a subalpine, coniferous forest. Can. J. Bot. 58: 1704-1721.
- BISSET, J. & P. WIDDEN, 1972. An automatic, multichamber soil-washing apparatus for removing fungal spores from soil. Can. J. Microbiol. 18:.
- BLAKEMAN, J. P. & A. SZTEJNBERG, 1973. Effect of surface wax on inhibition of germination of *Botrytis cinerea* on beetroot leaves. Physiol. Pl. Path. 3: 269-278.
- BLAKESLEE, A. F. 1915. Lindner's roll tube method of separation cultures. Phytopathology 5: 68-69.
- BOEDIJN, K. B. 1956. Trypan blue as a stain for fungi. Stain Technology 31: 115-116.
- BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium* Ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England 237 pp.
- BOPAIAN, B. M., M. SUHAS, P. WANI & P. V. RAI, 1978. Phyllosphere microflora of some common plants. Mysore J. Agric. Sci. 12: 398-403.

- BREEZE, E. M. & N. J. DIX, 1981. Seasonal analysis of the fungal community on *Acer platanoides* leaves. Trans. Br. Mycol. Soc. 77 (2): 321-328.
- BUNSTER REYES, L., 1981. Sucesión fúngica asociada a la descomposición de acículas de *Pinus radiata*. Tesis para optar al grado de Licenciado en Biología. Universidad de Valparaíso, Facultad de Medicina. Chile.
- BURG, A. van der., 1974. The occurrence of *Sporobolomyces roseus*, a red yeast on leaves of *Phragmites australis*. Thesis, Free University of Amsterdam.
- CABRAL, D. 1982. Contribución al estudio de la filosfera de *Eucalyptus viminalis*. Dinámica de las poblaciones fúngicas. Tesis. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- CABRAL, D., 1985. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*: Dynamics of fungal populations. Trans. Br. Mycol. Soc. 85 (3): 501-511.
- CABRAL, D. & M. COLLANTES 1992. La Filosfera de *Eucalyptus viminalis* (Myrtaceae) IV: Estructura, dinámica y desarrollo de la comunidad fúngica.
- CABRERA, A. L., 1968. Flora de la provincia de Buenos Aires I. Colección Científica del INTA, Buenos Aires. 623p.
- CANAVESI, F. 1987. Beziehungen zwischen Endophytischen Pilzen von *Abies alba* Mill. und den Pilzen der nadelstreue. Dissertation. ETH N^o. 8325, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland.

- CAPPANNINI, D. A., 1968. Principales unidades edáficas de la provincia de Buenos Aires. En Cabrera, A. L., Flora de la provincia de Buenos Aires, Tomo IV, Parte I. Colección Científica del INTA, Buenos Aires. 623p.
- CARROLL, G. C., 1979. Needle microepiphytes in a Douglas fir canopy biomass and distribution patterns. Can. J. Bot. 57 (9): 1000-1007.
- CARROLL, G. C., & F. E. CARROLL, 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. Can. J. Bot. 56 (24): 3034-3043.
- CARROLL, F. E., E. MÜLLER & B. C. SUTTON, 1977. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some european conifers. Sydowia 29: 87-103.
- CLARK, C. A. & J. W. LORBEER, 1976. The development of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves as affected by exogenous nutrients and epiphytic bacteria. In Microbiology of aerial plant surfaces. C. H. Dickinson and T. F. Preece Ed. Academic Press, London, 669 pp.
- COLE, J. S. 1976. The formation and dispersal of *Erysiphe* conidia. In Microbiology of aerial plant surfaces. C. H. Dickinson and T. F. Preece Ed. Academic Press, London, 669 pp.
- COLLINS, M. A. 1976. Colonization of leaves by phylloplane saprophytes and their interactions in this environment. In Microbiology of aerial plant surfaces. C. H. Dickinson and T. F. Preece Ed. Academic Press, London, pp. 401-418.

- COLLINS, M. A., & A. J. HAYES, 1976. Seasonal incidence of microbes on the surface of first year needles of Norway Spruce. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66 (3): 457-461.
- COOK, R. 1954. The use of antibiotics in media for the isolation of fungi from polluted water. *Antibiotics and Chemotherapy* 4: 657-662.
- CUTTER, E. G. 1976. Aspects of the structure and development of the aerial surfaces of higher plants. In *Microbiology of aerial plant surfaces*. C. H. Dickinson and T. F. Preece Ed. Academic Press, London, 669 pp.
- CHESTERS, C. G. C. 1948. Concerning fungi inhabiting the soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 32: 197-216.
- DAVENPORT, R. R. 1976. Ecological concept in studies of micro-organisms on aerial plant surfaces. In *Microbiology of aerial plant surfaces*. C. H. Dickinson and T. F. Preece Ed. Academic Press, London, 669 pp.
- DAVIES, F. R. 1935. The superiority of silver nitrate over mercuric chloride for the surface sterilisation of seeds in the isolation of *Ophiobolus graminis*. *Can. J. Res.* 13: 168-173.
- DICKINSON, C. H. 1965. The mycoflora associated with *Halimione portulacoides* III. Fungi on green and moribund leaves. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 48 (4): 603-610.
- DICKINSON, C. H. 1967. Fungal colonization of *Pisum* leaves. *Can. J. Bot.* 45: 915-927.
- DICKINSON, C. H. 1973a. Interactions of fungicides and leaf

- saprophytes. Pesticide Science 4: 563-574.
- DICKINSON, C. H. 1973b. Effects of Ethirimol and zineb on phylloplane microflora of barley. Trans. Br. Mycol. Soc. 60: 423-431.
- DICKINSON, C. H. 1976. Fungi on the aerial surfaces of higher plants. In Microbiology of aerial plant surfaces. C. H. Dickinson and T. F. Preece Ed. Academic Press, London. 669 pp.
- DICKINSON, C. H. 1981. Biology of *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* and *C. herbarum* in respect of their activity on green plants. In Microbial Ecology of the Phylloplane. J. P. Blakeman Ed. pp. 169-184. Academic Press, London.
- DICKINSON, C. H., & G. MORGAN-JONES, 1966. The mycoflora associated with *Halimione portulacoides* IV. Observations on some species of Sphaeropsidales. Trans. Br. Mycol. Soc. 49 (1): 43-55.
- DICKINSON, C. H., & B. WALLACE, 1976. Effects of late applications of foliar fungicides on activity of micro-organisms on winter wheat flag leaves. Trans. Br. Mycol. Soc. 67: 103-112.
- DICKINSON, D. H., & P. R. WALPOLE, 1975. The effect of late application of fungicides on the yield of winter wheat. Experimental Husbandry 29: 23-28.
- DICKINSON, C. H., J. WATSON & B. WALLACE, 1974. An impression method for examining epiphytic microorganisms and its

- application to phylloplane studies. Trans. Br. Mycol. Soc. 63: 616-619.
- DIEM, H. G. 1971. Effect of low humidity on the survival of germinated spores commonly found in the phyllosphere. In Ecology of leaf surface microorganisms. T. F. Preece and C. H. Dickinson Eds. Academic Press, London, pp. 211-219.
- DIEM, H. G. 1974. Micro-organisms of the leaf surface: Estimation of the mycoflora of de barley phyllosphere. J. of Gen. Microb. 80: 77-83.
- DIX, N. J. & J. WEBSTER 1995. Colonization and decomposition of leaves. In Fungal Ecology pp. 85-127. Eds. Chapman & Hall, London.
- DIXON, W. 1981. B.M.D.P. Statistical Software. University of California Press. Berkeley U.S.A.
- DOMSCH, K. H., TH. BECK, J. P. E. ANDERSON, B. SÖDERSTRÖM, D. PARKINSON & G. TROLLDENIER 1979. A comparison of methods for soil microbial population and biomass studies. Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd. 142: 520-533.
- DOMSCH, K. H., W. GAMS & T. H. ANDERSON. 1980. Compendium of Soil Fungi. Vol.1 Academic Press., London.
- EGLINTON, G. & R. J. HAMILTON, 1967. Leaf epicuticular waxes. Science 156: 1322-1335.
- ELLIS, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes Ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England 608 pp.
- ELLIS, M. B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 507 pp.

- ESPINOSA GARCIA, F. J. & J. H. LANGENHEIM, 1990. The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population. Diversity and spatial patterns. *New Phytologist* 116: 89-98.
- FAIFER, G. C., & M. D. BERTONI, 1988. Interactions between epiphytes and endophytes from the phyllosphere of *Eucalyptus viminalis* III.
- FRANKLAND, J. C. 1966. Succession of fungi on decaying petioles of *Pteridium aquilinum*. *J. of Ecol.* 54 (1): 41-63.
- FRANKLAND, J. C. 1992. Mechanisms in Fungal Succession. In the *Fungal Community*. Eds. G. Carroll and D. Wicklow. Marcel Dekker, New York.
- GAMS, W. 1971. *Cephalosporium- artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)* Ed. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- GAMUNDI, I. J., A. M. ARAMBARRI & A. M. BUCSINSZKY, 1979. Micoflora de la hojarasca de *Nothofagus dombeyi* II. *Darwiniana* 22 (1-3): 189-216.
- GAMUNDI, I. J., A. M. ARAMBARRI, J. FRANGI & H. A. SPINEDI, 1983. Variación estacional de la micoflora en la hojarasca de *Nothofagus dombeyi*. *Revista del Museo de La Plata, nueva serie* 13 (74): 123-141.
- GAMUNDI, I. J., A. M. ARAMBARRI & A. L. GIAIOTTI, 1977. Micoflora de la hojarasca de *Nothofagus dombeyi* I. *Darwiniana* 21 (1): 81-114.
- GAMUNDI, I. J., A. M. ARAMBARRI & H. A. SPINEDI, 1987. Sucesión fúngica en la hojarasca de *Nothofagus dombeyi*. *Revista del Museo de La Plata, nueva serie* 14 (92):

- GARRETT, S. D. 1951. Ecological groups of soil fungi: a survey of substrate relationships. *New. Phytol.*, 50: 149-
- GODEAS, A. M. 1977. Estudio cuali- y cuantitativo de los hongos del suelo del bosque de *Nothofagus dombeyi*, 60 págs. Tesis inédita, Fac. Cs. Exact. y Nat., Univ. Bs. As.
- GODEAS, A. M. 1982. Variation of fungal activity and populations during colonization of leaf litter in a *Pinus taeda* forest. *Physis Secc. C*, 41 (100): 125-130.
- GODEAS, A. M. 1987. Decomposition studies on *Pinus taeda* forest II. Decomposition of leaf litter. *Pedobiologia* 30: 323-331.
- GODFREY, B. E. S. 1974. Phylloplane mycoflora of bracken, *Pteridium aquilinum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 62 (1): 305-311.
- GODFREY, B. E. S. 1976. Leachates from aerial parts of plants and their relation to plant surface microbial populations. In *Microbiology of aerial plant surfaces*. C. H. Dickinson and T. F. Preece Eds. Academic Press, London.
- GOLFARI, L. 1965. Regiones potencialmente aptas para plantaciones de pinos y otras coníferas en América Latina. IDIA, Suplemento Forestal Nº 2, INTA.
- GOOD, J. E. G. 1974. Naturally occurring growth regulators in leaf washings of *Picea sitchensis* (Bong)carr. and *Betula pendula* Roth. *Planta* 116: 45-54.
- GOOD, H. M.; & P. G. M. ZATHURECZKY, 1967. Effects of drying on the viability of germinated spores of *Botrytis cinerea*, *Cercospora musae* and *Monilinia fructicola*. *Phytopathology* 57: 719-722.

- GOURBIÈRE, F. 1974a. Microscopic fungi on fir needles (*Abies alba* Mill.) I. First results. Bull. Trimest. Soc. Mycol. Fr. 90: 87-96.
- GOURBIÈRE, F. 1974b. Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de sapin (*Abies alba* Mill.) II. Variations saisonnières de la microflore des aiguilles tombantes. Bull. Soc. Mycol. Fr. 90 (4): 325-333.
- GOURBIÈRE, F. 1975. Microscopic fungi associated with Silver fir (*Abies alba* Mill.) needles III. Microflora of living needles. Bull. Trimest. Soc. Mycol. Fr. 91 (3): 429-441.
- GOURBIÈRE, F. 1983. Champignons des aiguilles de sapin (*Abies alba* Mill.) 9. Microflores internes. Bull. Trimest. Soc. Mycol. Fr. 99 (2): 203-215.
- GRACE, J. & M. A. COLLINS, 1976. Spore liberation from leaves by wind. In Microbiology of Aerial Plant Surfaces. C. H. Dickinson and T. F. Preece Eds. Academic Press, London 669 pp.
- GREEN, R. H. 1979. Sampling Design and Statistical Analysis for Environmental Biologists. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- GREGORY, P. H. 1971. The leaf as spore trap. In Ecology of leaf surface micro-organisms. Eds. T. F. Preece and C. H. Dickinson. Academic Press, New York.
- GREGORY, P. H. 1973. The microbiology of the atmosphere. Leonard Hill Ed., London.
- GREMME, J. 1963. Conifer inhabiting fungi II. Nova Hedwigia 6

(1-2).

GREMMEN, J. 1976. Fungi colonizing living and dead tissues of *Pinus sylvestris* and *P. nigra*. Kew Bull. 31: 455-460.

HARLEY, J. L. & J. S. WAID, 1955. A method of studying active mycelia on living roots and other surfaces in the soil. Trans. Br. Mycol. Soc. 38: 104-118.

HARLOW, W. M. 1947. The identification of the pines of the united states, native and introduced, by needle structure. Technical Publication No 32. Bulletin of the New York State College of Forestry at Syracuse University 20 (2).

HASEBE, A., S. KANAZAWA & Y. TAKAI 1984. Microbial biomass in paddy soil I. Microbial biomass calculated from direct count using fluorescence microscope. Soil Sci. Plant Nutr., 30 (2), 175-187.

HAWKSWORTH, D. L., B. C. SUTTON & G. C. AINSWORTH 1983. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Comm. Myc. Inst., Kew, 445 pp.

HEIDER, R. J. 1956. Handb. Pfl. Physiol. 2: (468-488).

HERING, T. F. 1965. Succession of fungi in the litter of a lake District oakwood. Trans. Br. Mycol. Soc. 48: 391-408.

HERING, T. F. 1966. An automatic soil-washing apparatus for fungal isolation. Plant Soil 25 (2): 195-200.

HERMANIDES- NIJHOF, E. J. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. Studies in Mycology No 15 Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn.

HESLOP-HARRISON, Y. 1975. Enzyme release in carnivorous plants.

In Lysosomes in Biology and Pathology. Eds. J. T. Dingle and R. T. Dean. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 525-578.

HISLOP, E. C. 1976. Some effects of fungicides and other agrochemicals on the microbiology of the aerial surfaces of plant. In Microbiology of Aerial Plant Surfaces. C. H. Dickinson and T. F. Preece Eds. Academic Press, London. pp.

HOGG, B. M. & H. J. HUDSON, 1966. Microfungi on leaves of *Fagus sylvatica* L. Microfungal succession. Trans. Br. Mycol. Soc. 49: 185-192.

HOLDRIDGE, L. R. 1947. Determination of world plant formation from simple climatic data. Science, 105: 367-368.

HUDSON, H. J. 1962. Succession of micro-fungi on ageing leaves of *Saccharum officinarum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 45: 395- .

HUDSON, H. J. 1968. The ecology of fungi on plant remains above the soil. New Phytol. 67: 836-874.

HUDSON, H. J. 1971. The development of the saprophytic fungal flora as leaves senesce and fall. In Ecology of leaf surface microorganisms. T. F. Preece and C. H. Dickinson Eds. Academic Press, London, pp. .

HUDSON, H. J. & J. WEBSTER, 1958. Succession of fungi on decaying stems of *Agropyron repens*. Trans. Br. Mycol. Soc. 41: 165-177.

HUGHES, S. J. 1966. New Zealand Fungi. 7 *Capnocybe* and *Capnophialophora*, new form genera of sooty moulds. New. Z. J.

Bot. 4: 333-353.

HUGHES, S. J. 1967. New Zealand Fungi. 9 *Ophiocapnocybe* with *Hormiokrypsis* and *Capnophialophora* states. New Zealand Journal of Botany vol.5 No 1 117-133.

HUGHES, S. J. 1974. New Zealand Fungi 22. *Euantennaria* with *Antennatula* and *Hormisciomyces* states. New Z. J. Bot. 12: 299-356.

HUGHES, S. J. 1976 Sooty Moulds Mycologia vol. 68: 693-820.

HUGHES, S. J. & J. SUGIYAMA. 1972. New Zealand Fungi 18. *Xylohypha* (Fr.) Mason. New Zealand Journal of Botany 10: 447-460.

IVORY, M. H. 1972. Infection of *Pinus radiata* foliage by *Scirrhia pini*. Trans. Br. Mycol. Soc. 59: 365-375.

JANES, B. S. 1962. Leaf clearing technique to assist fungal spore germination counts. Nature, London 193: 1099-1100.

JEFFREE, C. E., E. A. BAKER & P. J. HOLLOWAY, 1976. Origins of the fine structure of plant cuticular waxes. In Microbiology of Aerial Plant Surfaces. C. H. Dickinson and T. F. Preece Eds. pp. 119-158 Academic Press, London.

JENSEN, H. L. 1930. Actinomycetes in Danish soils. Soil Science 30: 59-77.

JENSEN, W. A. 1962. Botanical histochemistry. W. H. Freeman and Co., San Francisco. 408 p.

JOHNSON, L. F., E. A. CURL, J. H. BOND & H. A. FRIBOURG, 1959. Methods for studying soil microflora-plant-disease relationships. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing

Company.

- JONES, S. G. 1935. The structure of *Lophodermium pinastri* (Schröd.). Chev. Ann. Bot. 49: 699-728.
- JONES, P. C. T. & J. E. MOLLISON, 1948. A technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms. J. Gen. Microbiol., 2 (1): 54-69.
- JUNIPER, B. E. 1959. Growth, development and effect of the environment on the ultra-structure of plant surfaces. Journal of the Linnean Society (Botany) 56: 413-419.
- KAHLKI, R., M. KLOIDT & G. LYSEK, 1986. Phylloplane inhabiting fungi of pine needles (*Pinus sylvestris* L.) in Berlin (West). Nova Hedwigia 42 (2-4): 597-601.
- KENDRICK, W. B. & A. DURGES, 1962. Biological aspects of the decay of *Pinus sylvestris* leaf litter. Nova Hedwigia, Z. Kryptogamenkd., 4: 313-342.
- KENNEL, N. C. & T. DOOTH 1992. Multivariate Analysis in Fungal Ecology. In The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem. Eds. G. C. Carroll and D. T. Wicklow.
- KERLING, L. C. F. 1958. De microflora op het blad van *Beta vulgaris*. Tijdschr. Plantenziekten, 64: 402-410.
- KEYWORTH, W. G. 1951. A petri dish chamber. Trans. Br. Mycol. Soc. 34: 291-292.
- KINKEL, L. 1991. Fungal community dynamics, pp. 253-270. In Microbial Ecology of leaves. Eds. J. H. Andrews y S. S. Hirano. Springer-Verlag. New York.
- KLINCARE, A. A., D. J. KRESLINA & I. V. MISHKE, 1971.

- Composition and activity of the epiphytic microflora of some agricultural plants. In Ecology of leaf surface microorganisms. T. F. Preece and C. H. Dickinson Eds. Academic Press, London, pp. .
- KOEPPEN, W. 1948. Climatología. México, D. F. Fondo cultura económica, 478p.
- KOVACS, A. & E. SZEOKE, 1956. Die phytopathologische Zeitschrift 27: 335-349.
- LACEY J. 1981. The Aerobiology of Conidial Fungi, pp. 373-410. In Biology of Conidial Fungi vol. I. Eds. G. T. Cole and B. Kendrick. Academic Press, New York.
- LAGUARDIA, A. M. & J. A. BOTTAZZI 1971. Histotaxonomía foliar de pinos cultivados en el Uruguay. Boletín Nº 119 de la Facultad de Agronomía de Montevideo.
- LAMB, R. J. & J. F. BROWN, 1970. Non-parasitic mycoflora on leaf surfaces of *Paspalum dilatatum*, *Salix babylonica* and *Eucalyptus stellulata*. Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 383-390.
- LANGERON, M. & R. VANBREUSEGHEM, 1965. Outline of Mycology, 2nd. ed. London: Pitman.
- LAST, F. T. 1955. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. Trans. Br. Mycol. Soc. 8 (3): 221-239.
- LAST, F. T. 1970. Factors associated with the distribution of some phylloplane microbes. Netherlands Journal of Plant Pathology, 76: 140-143.
- LAST, F. T. & F. C. DEIGHTON, 1965. The non-parasitic microflora on the surfaces of living leaves. Trans. Br.

- Mycol. Soc. 48 (1): 83-99.
- LAST, F. I. & R. C. WARREN, 1972. Non-parasitic microbes colonizing green leaves their form and functions. Endeavour, 31 (114).
- LATCH, G. C. M. & E. H. C. MCKENZIE, 1977. Fungal flora of ryegrass swards in Wales. Trans. Br. Mycol. Soc. 68 (2): 181-184.
- LAUSBERG, T. 1935. Jb. Wis. Bot. 81: 769-806.
- LEACH, C. M. 1967. Interaction of near ultra-violet light and temperature on sporulation of the fungi, *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Stemphylium*. Can. J. Bot. 45: 1999-2016.
- LEACH, C. M. 1971. A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi. In Methods in Microbiology vol. 4. C. Booth Ed. Academic Press, London.
- LEBEN, C. I. 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. Annual Review of Phytopathology 3: 209-230.
- LEBEN, C. 1971. The bud in relation to the epiphytic microflora, pp. 117-127. In Ecology of leaf surface micro-organisms. Eds. T. F. Preece and C. H. Dickinson. Academic Press, London.
- LEGAULT, D., M. DESSUREAULT & G. LAFLAMME 1989a. Mycoflora of *Pinus banksiana* and *Pinus resinosa*. II. Epiphytic fungi. Can. J. Bot. 67: 2061-2065.
- LEGAULT, D., M. DESSUREAULT & G. LAFLAMME 1989b. Mycoflore des aiguilles de *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa*. I.

- Champignons endophytes. Can. J. Bot. 67: 2052-2060.
- LEHMANN, P. F. & H. J. HUDSON, 1977. The fungal succession on normal and urea treated pine needles. Trans. Br. Mycol. Soc. 68: 221-228.
- LINDSEY, B. I. 1973. Ecological studies of fungi associated with *Hippophae rhamnoides* L. Ph. D. Thesis, University of Nottingham.
- LINDSEY, B. I. & G. J. F. PUGH, 1976. Succession of microfungi on attached leaves of *Hippophae rhamnoides*. Trans. Br. Mycol. Soc. 67 (1): 61-67.
- LITTLE, E. L. Jr & W. B. CRITCHFIELD, 1969. Subdivisions of the Genus *Pinus* (pines). Miscellaneous Publication No 1144. U. S. Department of Agriculture. Forest Service, Washington, D. C.
- LODDER, J. & N. J. W. K. VAN RIJ, 1952. The Yeasts. Amsterdam: North Holland, 713 pp.
- LYON, N. C. & W. C. MUELLER, 1974. A freeze-etch study of plant cell walls for ectodesmata. Can. J. Bot. 52: 2033-2036.
- MARTIN, J. P. 1950. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Science 69: 215-232.
- MARTIN, J. T. & R. E. JUNIPER 1970. The Cuticles of Plants. Edward Arnold, London. 347 pp.
- MARTIN, R. J. L. & C. L. STOTT, 1957. The physical factors involved in the drying of sultana grapes. Australian Journal of Agricultural Research 8: 444-459.
- MAYFIELD, C. I., S. T. WILLIAMS, S. M. RUDDICK, & H. L. HATFIELD, 1972. Studies on the ecology of Actinomycetes in

- soil. IV Observations on the form and growth of Streptomycetes in soil. Soil Biology and Biochemistry 4: 79-91.
- MAZUR, P. & W. H. WESTON, 1956. The effects of spray-drying on the viability of fungous spores. Journal of Bacteriology 71: 257-266.
- McBRIDE, R. P., & A. J. HAYES, 1977. Phylloplane of european larch. Trans. Br. Mycol. Soc. 69 (1): 39-46.
- McKENZIE, E. H. C. 1971. Seasonal changes in fungal spore numbers in ryegrass, white clover pasture, and the effects of benomyl on pasture fungi. N. Z. J. Agric. Res. 14: 379-392.
- MENNA, M. E. di 1959. Yeasts from the leaves of pasture plants. N. Z. J. Agric. Res. 2: 394-405.
- MENNA, M. E. di 1970. N. Z. J. Agric. Res. 13: 51-68.
- MENNA, M. E. di 1971. The mycoflora of leaves of pasture plants in New Zealand, pp. 159-174. In Ecology of leaf surface micro-organisms. T. F. Preece and C. H. Dickinson Eds. Academic Press, London.
- MEREDITH, D. S. 1962. Some fungi on decaying banana leaves in Jamaica. Trans. Br. Mycol. Soc. 45: 335-347.
- MEREDITH, D. S. 1963. Violent spore release in some Fungi Imperfecti. Annals of Botany 27: 39-47.
- MEREDITH, D. S. 1966. Diurnal periodicity and violent liberation of conidia in Epicoccum. Phytopathology 56: 988.
- MEYER, E. D., N. A. SINCLAIR, & B. NAGY, 1975. Comparison of the survival and metabolic activity of psychrophilic and mesophilic yeast subjected to freeze-thaw stress. Applied

- Microbiology 29: 739-744.
- MILLAR, C. S. 1974. Decomposition of coniferous leaf litter. In Biology of Plant litter Decomposition, Vol. I. C. H. Dickinson and G. J. F. Pugh Eds. pp. 105-128. Academic Press, London.
- MILLAR, C. S. 1981. Infection processes on conifer needles. In Microbial Ecology of the Phylloplane. J. P. Blakeman Ed. Academic Press, London.
- MILLER, W. A., & K. W. ROY, 1982. Mycoflora of soybean leaves, pods and seeds in Mississippi. Can. J. Bot. 60:
- MINTER, D. W. 1981. Microfungi on needles, twigs and cones of pines in Czechoslovakia. Ceská Mykologie 35 (2): 90- .
- MISHRA, R. R., & P. K. DAS, 1981. Fungal succession on conifer needles. In Microbial Ecology of the Phylloplane. J. P. Blakeman Ed. Academic Press, London, pp. 475-485.
- MISHRA, R. R., & C. H. DICKINSON, 1981. Phylloplane and litter fungi of *Ilex aquifolium*. Trans. Br. Mycol. Soc. 77 (2): 329-337.
- MISHRA, R. R., & C. H. DICKINSON, 1984. Experimental studies of phylloplane and litter fungi on *Ilex aquifolium*. Trans. Br. Mycol. Soc. 82 (4): 595-604.
- MORGAN, J. V. 1963. M. S. Thesis, Cornell Univ., Ithaca, N. Y.
- MUELLER-DOMBOIS, D., & H. ELLENBERG, 1974. Aims and methods of Vegetation Ecology. J. Wiley Intern.
- NICHOLAS, D. P. & D. PARKINSON, 1967. A comparison of methods for assessing the amount of fungal mycelium in soil samples. Pedobiologia, Bd. 7: 23-41.

- NORSE, D. 1972a. Fungal populations of tobacco leaves and their effect on the growth of *Alternaria longipes*. Trans. Br. Mycol. Soc. 59 (2): 261-271.
- NORSE, D. 1972b. Fungi isolated from surface-sterilized tobacco leaves. Trans. Br. Mycol. Soc. 58 (3): 515-518.
- NOLSON, F. C. W. 1950. Quantitative estimates of filamentous algae. Trans. American. Microsc. Soc. 69 (3): 272-279.
- PAGE, M. A. & R. CAMPBELL, 1974. The effect of saprophytes on infection of leaves of *Brassica* spp. by *Alternaria brassicicola*. Trans. Br. Mycol. Soc. 63: 193-196.
- PADY, S. M. 1974. Sporobolomycetaceae in Kansas. Mycologia 66: 333-338.
- PANDEY, R. R. 1990. Succession of microfungi on leaves of *Psidium guajava* L. Bull. Torrey Bot. Club., 117 (2): 153-162.
- PAPADAKIS, J. 1962. Avances recientes en el estudio hidrico de los climas. IDIA, Buenos Aires, 175: 1-28.
- PAPADAKIS, J. 1980. El Clima. Ed. Albatros, Buenos Aires. 377 pp.
- PARK, D. 1957. Behaviour of soil fungi in the presence of bacterial antagonists. Trans. Br. Mycol. Soc. 40: 283-291.
- PARK, D. 1968. The ecology of terrestrial fungi. In The Fungi, an advanced treatise vol. 3: 5-39. Eds. Ainsworth, G. C. & A. S. Sussman. Academic Press, London.
- PARKINSON, D. & S. T. WILLIAMS, 1961. A method for isolating fungi from soil micro-habitats. Plant and Soil 13: 347-355.
- PEDGLEY, D. E. 1991. Aerobiology: The Atmosphere as a Source and Sink for Microbes, pp. 43-59. In Microbial Ecology of

- leaves. Eds. J. H. Andrews and S. S. Hirano. Springer-Verlag, New York.
- PENNYCOOK, S. R. & F. J. NEWHOOK, 1974. Diel periodicity and circadian rhythm of ballistospore discharge in the Sporobolomycetaceae. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 63: 237-248.
- PENNYCOOK, S. R. & F. J. NEWHOOK, 1981. Seasonal changes in the apple phylloplane microflora. *N. Z. J. Bot.* 19: 273-283.
- PESANTE, A. 1963. Considerazione su una fumagynie d'aspetto inconsueto. *Bollettino del Laboratorio sperimentale e Osservatorio di fitopatologia* 26: 19-26.
- PETRINI, O. 1992. Fungal Endophytes of tree leaves pp. 179-197. In *Microbial Ecology of leaves*. Eds. J. H. Andrews and S. H. Hirano. Springer-Verlag, New York.
- POTTER, M. C. 1910. Bacteria in their relation to plant pathology. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 3: 150-168.
- PUGH, G. J. F. 1958. Leaf litter fungi found in *Carex paniculata* L. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 41: 185.
- PUGH, G. J. F. 1962. Studies on fungi in coastal soil. I *Cercospora salina* Sutherland. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 45: 255-260.
- PUGH, G. J. F. 1974. Terrestrial Fungi. In *Biology of plant litter decomposition*. C. H. Dickinson y G. J. F. Pugh Eds. Academic Press, London.
- PUGH, G. J. F. 1980. Strategies in Fungal Ecology. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 75 (1): 1-14.
- PUGH, G. J. F. & L. BODDY 1988. A view of disturbance and life

- strategies in fungi, pp. 3-11. In Fungi and Ecological Disturbance Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B vol. 94. Eds. L. Boddy, R. Watling & A. J. E. Lyon.
- PUGH, G. J. F. & N. G. BUCKLEY, 1971. The leaf surface as a substrate for colonization by fungi. In Ecology of leaf-surface micro-organisms. T. F. Preece and C. H. Dickinson Eds. pp. 431-445. Academic Press, London.
- PUGH, G. J. F. & B. I. LINDSEY, 1975. Studies of *Sporobolomyces* in a maritime habitat. Trans. Br. Mycol. Soc. 65: 201-209.
- PUNITHALINGAM, E. 1981. Studies on Sphaeropsidales in culture III. Mycological Papers No 149: 1-60.
- PURNELL, T. J. 1971. Effects of pre-inoculation washing of leaves with water on subsequent infections by *Erysiphe cruficerarum*, pp. 269-275. In Ecology of leaf surface micro-organisms. Eds. T. F. Preece and C. H. Dickinson. Academic Press, London.
- RAPER, K. B. & D. I. FENNELL 1965. The Genus *Aspergillus* Ed. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, U.S.A.
- REESE, E. I. 1947. On the effect of aeration and nutrition on cellulose decomposition by certain bacteria. J. Bact., 53: 389.
- REESE, E. T. & H. S. LEVINSON, 1952. Physiol. Pl. 5: 345-366.
- RISHBETH, J. & D. S. MEREDITH, 1957. Surface microflora on pine needles. Nature, Lond. 179: 682-683.
- ROGERS, J. A. 1961. The autecology of *Hippophae rhamnoides* L. Ph. D. Thesis, University of Nottingham.
- RUINEN, J. 1956. Occurrence of *Beijerinckia* species in the

- phyllosphere. Nature 177: 220-221.
- RUINEN, J. 1961. The phyllosphere I. An ecologically neglected milieu. Pl. Soil 15 (2): 81-109.
- RUINEN, J. 1963. The phyllosphere II. Yeasts from the phyllosphere of Tropical Foliage. Antonie van Leeuwenhoek, Ned. Tijdschr. Hyg. 29: 425-438.
- RUSCOE, D. W. 1971. Mycoflora of living and dead leaves of *Nothofagus truncata*. Trans. Br. Mycol. Soc. 56: 463-474.
- SAITO, T. 1956. Microbiological decomposition of beech litter. Ecol. Rev., Sendai, 14: 141.
- SCHUCK, H. J. 1969. The composition of needle wax in *Pinus silvestris* L. as affected by the locality of origin of the trees and the age of the needles and its importance for susceptibility to attack by *Lophodermium pinastri* (Schr.) Chev. Ph. D. Thesis, University of Saarland.
- SCHÜTT, P. & H. J. SCHUCK, 1973. Jahreszeitliche Schwankungen in der Zusammensetzung der Cuticularwachse von *Pinus silvestris*. Flora 162: 206-214.
- SHARMA, K. R. & K. G. MUKERJI, 1976. Microbial ecology of *Sesamum orientale* L. and *Gossypium hirsutum* L. In Microbiology of Aerial Plant Surfaces. C. H. Dickinson and T. F. Preece Eds. Academic Press, London.
- SHARMA, P. D. & A. P. GARG, 1979. Phylloplane mycoflora of non-infected and powdery mildew infected barley. Acta Botanica Indica 7: 64-71.
- SHELTON, M. G. & G. L. SWITZER 1984. Variation in the surface area relationships of Loblolly pine fascicles. Forest Sci. 30

(2): 355-363.

SHERWOOD, M. & G. C. CARROLL, 1974. Fungal succession on needles and young twigs of old-growth Douglas fir. *Mycologia* 66: 499-506.

SHIPTON, W. A. & J. F. BROWN, 1962. *Phytopath* 52: 1313.

SIEBER-CANAVESI, F. & T. N. SIEBER 1993. Successional patterns of fungal communities in needles of European silver fir (*Abies alba* Mill.). *New Phytol.* 125: 149-161.

SINHA, S. 1971. The microflora on leaves of *Capsicum annuum* (L.) Watt E. D., *Solanum melongena* L., *Solanum tuberosum* L., and *Lycopersicum esculentum* Mill., pp. 175-189. In *Ecology of leaf surface micro-organisms*. Eds. T. F. Preece and C. H. Dickinson. Academic Press, London.

SIL, R. G. H. 1951. *Microbial decomposition of cellulose*. Rheinhold Publishing Corp., New York.

STEINMULLER, D. & M. TREVINI 1985. Action of ultraviolet radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. *Planta* 164: 557-564.

STEYAERT, R. L. 1961. Type specimens of Spegazzini's collections in the "Pestalotiopsis" and related genera (Fungi Imperfecti; "Melanconiales") *Darwiniana* 12 (2): 157-190.

SUTTON, B. C. 1980. *The Coelomycetes Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata*. Ed. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England.

SWIFT, M. J. 1976. Species diversity and the structure of microbial communities in terrestrial habitats pp. 185-222. In

The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition. J. M. Anderson and A. MacFadyen Eds. Blackwell Scientific. Publ., Oxford.

THOMAS, A., D. P. NICHOLAS & D. PARKINSON, 1965. Modifications of the agar film technique for assaying lengths of mycelium in soil. *Nature* 205: 105- .

TUKEY, H. B. Jr. 1971. Leaching of substances from plants. In *Ecology of leaf surface micro-organisms*. T. F. Preece and C. H. Dickinson Eds. Academic Press, London.

TUKEY, H. B. Jr., MECKLENBURG, R. A., & MORGAN, J. V. 1965. In *Isotopes and radiation in soil plant nutrition studies*. Intern. Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 371-385.

VISSER, S. & D. PARKINSON, 1975. Fungal succession on aspen poplar leaf litter. *Can. J. Bot.* 53: 1640-1651.

WALTER, H. & H. LIETH, 1960. *Klimadiagramm-Weltatlas*. Jena, Gustav Fisher Verlag.

WARREN, R. C. 1972. The effect of pollen on the fungal leaf microflora of *Beta vulgaris* L. and on infection of leaves by *Phoma betae*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 78: 89-98.

WATSON, E. S., D. C. McCLURKIN & M. B. HUNEYCUTT, 1974. Fungal succession on Loblolly pine and upland hardwood foliage and litter in north Mississippi. *Ecology* 55: 1128-1134.

WEBSTER, J. 1956. Succession of fungi on decaying cocksfoot culms I. *J. Ecol.* 44 (2): 517-544.

WEBSTER, J. 1957. Succession of fungi on decaying cocksfoot culms II. *J. Ecol.* 45 (1): 1-30.

- WELTZIEN, H. C. 1991. Biocontrol of Foliar Fungal Diseases with Compost Extracts, pp. 430-450. In *Microbial Ecology of Leaves*. Eds. J. H. Anrews and S. S. Hirano. Springer-Verlag, New York.
- WESTERDIJK, J. 1949. *Leeuwenhoek ned. Tijdschr* 15: 187-189.
- WHITTLE, A. M. 1977. Mycoflora of cones and seeds of *Pinus sylvestris*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 69 (1): 47-57.
- WILDMAN, H. G. & D. PARKINSON, 1979. Microfungal succession on living leaves of *Populus tremuloides*. *Can. J. Bot.* 57: 2800-2811.
- WILLIAMS, P. G., K. J. SCOTT & J. K. KUHL 1966. Vegetative growth of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in vitro. *Phytopathology* 56: 1418-1419.
- WILLIAMS, S. T., D. PARKINSON & N. A. BURGESS, 1965. An examination of the soil washing technique by its application to several soils. *Plant and Soil* 22 (2):
- WILSON, J. K. 1973. *Cornell Univ. Memoir* 65.
- WONG, J. N. F. & K. M. OLD, 1974. Electron microscopical studies of the colonization of conidia of *Cochliobolus sativus* by soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 6: 89-96.

INDICE

	pág. ...
1 INTRODUCCION.....	1
1.1 Factores que determinan la presencia y actividad de las poblaciones fúngicas.....	1
1.1.1 Disponibilidad de inóculo fúngico.....	1
1.1.2 La naturaleza de la superficie aérea de las plantas.....	2
1.1.3 Características químicas de la superficie de las plantas.....	5
1.1.4 El clima en la superficie de las plantas....	9
1.1.4.1 Temperatura.....	9
1.1.4.2 Lluvia y rocío.....	9
1.1.4.3 Humedad.....	10
1.1.4.4 Viento.....	10
1.1.4.5 Luz.....	10
1.1.5 Estado fisiológico y salud de la planta hospedante.....	10
1.1.6 Naturaleza de las comunidades de plantas superiores.....	11
1.1.7 Agroquímicos.....	11
1.2 Clasificación de los hongos epífitos de hojas...	12
1.3 Adaptaciones a la vida epífita.....	20
2 ANTECEDENTES.....	22

3	IMPORTANCIA DE LAS INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGIA	
	DE LAS HOJAS.....	127
4	OBJETIVOS.....	128
5	MATERIALES Y METODOS.....	130
5.1	Características del sitio de muestreo.....	130
5.1.1	Ubicación geográfica.....	130
5.1.2	Clima.....	130
5.1.3	Suelo.....	131
5.2	Características de la plantación.....	131
5.3	Características de la hoja.....	132
5.4	Muestreo.....	133
5.5	Humedad de las muestras.....	134
5.5.1	En distintos sectores de la hoja.....	134
5.5.2	En distintos estados de madurez y diferentes estaciones del año.....	134
5.6	Observaciones con Microscopio Electrónico de Barrido.....	135
5.6.1	En distintos sectores de la hoja.....	135
5.6.2	En distintos estados de madurez y diferentes estaciones del año.....	135
5.7	Análisis químico de las hojas.....	136
5.7.1	En distintos sectores de las hojas.....	136
5.7.2	En distintos estados de madurez y en diferentes estaciones del año.....	136
5.8	Anatomía Foliar.....	137
5.9	Análisis de las poblaciones fúngicas.....	137
5.9.1	Aislamiento de especies fúngicas.....	137

5.9.1.1 De distintos sectores de la hoja.....	140
5.9.1.2 De distintos estados de madurez y en diferentes estaciones del año.....	141
5.9.2 Identificación de las cepas.....	142
5.9.3 Determinación de la frecuencia de cada especie fúngica.....	143
5.9.4 Determinación del total de colonias.....	144
5.10 Longitud de micelio.....	144
5.10.1 En distintos sectores de la hoja.....	147
5.10.2 En distintos estados de madurez y diferentes estaciones del año.....	147
5.11 Cálculo de biomasa fúngica.....	148
5.12 Análisis de las comunidades fúngicas.....	148
5.12.1 En distintos estados de madurez de las hojas	152
5.12.2 En diferentes estaciones del año.....	152
6 RESULTADOS Y DISCUSION.....	153
6.A DISTINTOS SECTORES DE LA HOJA.....	153
6.A.1 Humedad de las muestras.....	153
6.A.2 Anatomía foliar.....	154
6.A.3 Determinaciones químicas.....	155
6.A.4 Observaciones con Microscopía Electrónica de Barrido.....	156
6.A.5 Longitud de micelio.....	158
6.A.6 Análisis de las poblaciones fúngicas.....	160
6.B DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ DE LA HOJA Y DIFEREN- TES ESTACIONES DEL AÑO.....	164
6.B.1 Humedad de las muestras.....	164

6.B.2 Determinaciones químicas.....	165
6.B.3 Observaciones con Microscopía Electrónica de Barrido.....	166
6.B.4 Longitud de micelio.....	169
6.B.5 Biomasa fúngica.....	171
6.B.6 Análisis de las poblaciones fúngicas.....	178
6.B.7 Secuencia de Colonización.....	196
6.B.8 Análisis de las comunidades fúngicas.....	199
6.B.8.1 En hojas en distintos estados de madurez..	199
6.B.8.2 En las diferentes estaciones del año.....	207
7 CONCLUSIONES.....	215
7.1 Distintos sectores de la hoja.....	215
7.2 Distintos estados de madurez y estaciones del año.	216
7.3 Comunidades fúngicas.....	219
8 BIBLIOGRAFIA.....	222

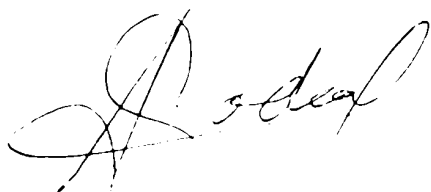
LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES SE HAN REALIZADO CON PARTE DE
LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS.

- VENEDIKIAN, N. 1984. Análisis de la Micoflora en hoja viva
de *Pinus taeda*. *Physis* 42 (102): 7-16.

- VENEDIKIAN, N. 1988. Presencia de *Pseudomorfea coffeae* en
la Argentina (Ascomycetes-Dothideales) *Bol. Soc. Arg. Bot.* 25
(3-4).

- VENEDIKIAN, N. y A. M. GODEAS 1995. Estudio de la Filosfera
de *Pinus taeda* I. (Pinaceae) I. Poblaciones Fúngicas. *Bol.*
Soc. Arg. Bot. 31 (3-4): (en prensa).

- VENEDIKIAN, N. y A. M. GODEAS 1995. Estudio de la Filosfera
de *Pinus taeda* I. (Pinaceae) II. Variación de la cantidad de
micelio y colonización de la hoja. *Physis* (en prensa).



Dra. ALICIA GODEAS



NADIA VENEDIKIAN